Aus dem Institut für Pathologie
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Damaliger Geschf. Direktor: Professor Dr. W. Maßhoff

DER EINFLUSS VON TWEEN 8o AUF PHAGOZYTOSERATE UND STRUKTUR VON KULTIVIERTEN PERITONEALMAKROPHAGEN DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter-Heinrich Bippus

aus Berlin

1975

Aus dem Institut für Pathologie
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz
Damaliger Geschf. Direktor: Professor Dr. W. Maßhoff

DER EINFLUSS VON TWEEN 8o AUF PHAGOZYTOSERATE UND STRUKTUR VON KULTIVIERTEN PERITONEALMAKROPHAGEN DER MAUS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter-Heinrich Bippus
aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

Korreferent: Prof. Dr. H.J. Merker

Promotionstag: 30. 5. 1975

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Inhaltsübersicht

		Seite
1.	Einleitung	3
1.1.	Definition und Bedeutung der Phagozytose	3
1.2.	Das System phagozytierender mononukleärer Zellen	7
1.3.	Herkunft, Morphologie und Funktion der Peritonealmakrophagen der Maus	9
1.4.	Die Struktur der Peritonealmakrophagen der Maus in der Zellkultur	11
1.5.	Wahl der Partikel für die Phagozytose	15
1.6.	Oberflächenaktive Substanzen und Phagozytose	16
1.7.	Wahl der oberflächenaktiven Substanz	21
2.	Material und Methodik	22
2.1.	Isolierung der Zellen	22
2.2.	Herstellung einschichtiger Deckglaskulturen	23
2.3.	Herstellung der Tuschelösung	24
2.4.	Herstellung der Tween 8o-Tusche-Lösung	24
2.5.	Durchführung der Versuche	25
2.6.	Auswertung	25
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Die Phagozytoserate unter Einfluß von Tween 8o	27
3.2.	Morphologisches Verhalten der Zellen in der Kultur nach Einwirkung von Tween 8o-haltigen und Tween-freien Lösungen	38
3.2.1.	Differenzierungsvorgänge in den Deckglaskulturen	38
3.2.2.	Zellbefunde in den Vitalpräparaten	47
4.	Diskussion	61
4.1.	Beeinflussung der Phagozytoserate	62
4.2.	Zellmorphologie	67
4.3.	Abschließende Betrachtung über den experimentell beeinflußbaren Phagozytose-Mechanismus	73
5.	Zusammenfassung	77
6.	Literaturverzeichnis	79

1. Einleitung

1.1. Definition und Bedeutung der Phagozytose

Unter Phagozytose, einem schon lange bekannten biologischen Phänomen, versteht man die Aufnahme fester, lichtmikroskopisch sichtbarer Partikel aus einem extrazellulären Milieu in die lebende Zelle. Die klassischen Untersuchungen über die Inkorporierung von Fremdmaterial durch Zellen bei zahlreichen Tieren gehen auf den russischen Zoologen METCHNIKOFF (1899) zurück.

Durch Ausstülpung der Zellmenbran oder Einstülpung derselben in das Zytoplasma und Abschnürung der vakuolenhaltigen Membran können korpuskuläre Bestandteile des Außenmediums in die Zelle aufgenommen werden. Die aus der Zellmembran hervorgehende Vakuolenmembran mit dem eingeschlossenen Partikel und die Zelle selbst erfahren sehr schnell tiefgreifende strukturelle und biochemische Veränderungen. Diese gehen mit der als Degranulation der Zelle mikroskopisch sichtbaren Entleerung von Enzymen aus den primären Lysosomen in die Phagozytosevakuole einher und enden mit dem Abbau der verdaubaren Anteile des Substrats und gegebenenfalls mit der Elimination oder Ablagerung unverdaulicher Restbestände als dichte Residualkörper (NORTH, 197o).

Ein in vieler Hinsicht ähnlicher Vorgang der Einverleibung exogenen Materials ist die Pinocytose, bei der die Zelle Flüssigkeit in Form von lichtmikroskopischen Tröpfchen aufnimmt. Ein weiteres verwandtes, jedoch nur im Bereich elektronenmikroskopischer Auflösung sichtbares Phänomen ist die Bildung zahlreicher kleinster Invaginationen der Zellmembran, die nach Abschnürung ihres Halses als geschlossene Bläschen, die kleine Mengen der die Zelloberfläche umspülenden Flüssigkeit enthalten, in das Zytoplasma wandern (Mikropinozytose). Diese mit einer morphologisch faßbaren reversiblen Umgestaltung der Zelloberfläche einhergehenden Transportvorgänge werden zusammengefaßt als Endozytose bezeichnet (NORTH, 197o). Sie werden

von TANAKA (1961) als Enmembranosis der Transmembranosis gegenübergestellt, die Diffusion, aktiven Transport und Absorption als morphologisch bisher nicht erkennbare Formen der Aufnahme von Substanzen in die Zelle umfaßt (Übersicht bei DERVICHIAN, 1955; PONDER, 1961).

Durch die Phagozytose erfolgt in erster Linie die Aufnahme und der Abbau von Mikroorganismen und anderen soliden Fremdmaterialien sowie von körpereigenen Partikeln und Substanzen, die als Folge des Zell- und Gewebeunterganges entstehen. Vorgänge dieser Art gehören zu den phylogenetisch ältesten Prinzipien der Abwehr. Die Abwehr von fremdem Material wie Tusche oder heterologen Zellen ist bereits bei Cölenteraten (CHENG et al., 1968 a,b,c) durch die Phagozytose möglich, der Speicherung und Wiederausscheidung folgen können. Beim Menschen ist die Phagozytose zentraler Bestandteil einer Anzahl von defensiven Prozessen des Organismus, unter denen die Entzündung und die Reparation eine besondere Stellung einnehmen. Außerdem kommt ihr eine Bedeutung bei immunbiologischen Vorgängen zu (Übersicht bei ROOS, 197o, UNANUE und CEROTTINI, 197o).

Die Phagozytose ist in zahlreichen auch experimentellen Untersuchungen studiert worden. Das umfangreiche Schrifttum findet sich in Übersichtsarbeiten von MUDD et al. (1934), BERRY und SPIES (1949), HARRIS (1961) und HIRSCH (1965).

Bei diesem Studium hat einerseits die Art des phagozytierten Materials und zum anderen das Verhalten der phagozytierenden Zelle interessiert. Die Phagozytose betrifft eine große Vielfalt von Substanzen und Zellen. Es können Zellen nach Sensibilisierung (BESSIS, 1954), auf andere Art geschädigte bzw. abgestorbene Zellen (BONA et al., 1967; RABINOVITCH und GARY, 1968) Tumorzellen (BENNETT et al., 1964), außerdem Granulozyten und Makrophagen und manchmal auch Plasmazellen phagozytiert werden (SWARTZENDRUBER und CONGDON, 1963). Die Pha-

gozytose betrifft ferner Bakterien (WHITBY und ROWLEY, 1939), Viren (FRIEND et al., 1969) und Antigen-Antikörper-Komplexe (SORKIN und BOYDEN, 1959).

Eine große Anzahl von verschiedensten Fremdstoffen und nichtorganischen Bestandteilen wie Latex (KORN und WEISMAN, 1967), Tusche, Quarzstaub, Asbest, Eisen, Beryllium, Plutonium u.a. kann von Zellen inkorporiert werden (POLICARD, 1962).

Die strukturellen Veränderungen der phagozytierenden Einzelzelle (ROBINEAUX und FREDERIC, 1955; HIRSCH, 1962) und die Stoffwechselveränderungen während der Phagozytose an und in der Zelle sind sehr eingehend untersucht worden (Übersicht bei AXLINE, 197o).

Die quantitative Bestimmung der Phagozytoseleistung wurde öfters mit der von HALPERN et al. (1954) entwickelten Methode der Partikel-Clearance in vivo durchgeführt. In begrenztem Umfange wurden zu diesem Zweck auch Zellpopulationen in vitro verwendet (JENKIN und BENACERRAF, 196o; CARPENTER und BARSALES, 1967; MICHELL et al., 1969; STOSSEL et al., 1972). Dabei fiel auf, daß die mit verschiedenen Methoden gemessene Kapazität phagozytierender Zellen sich nach einer gewissen Zeit erschöpft und eine bestimmte Grenze nicht überschreitet. Diese als "Blockade des RES" bezeichnete Grenze erscheint als eine temporäre oder lang andauernde funktionelle Sättigung phagozytierender Zellen, die von der Beschaffenheit, Größe und Konzentration der verwendeten Partikel, der Zahl der Zellen, der Verfügbarkeit unverbrauchter Serumfaktoren und Bestandteilen der Inkubationsflüssigkeiten wie Opsoninen, Glucose und Proeinen abhängt (Übersicht bei NORMAN et al., 1968). Auch die systematischen Messungen von MICHELL et al. in vitro (1969) lassen als allgemeine Regel eine von den Versuchsbedingungen jeweils abhängige obere Grenze der Phagozytoseaktivität eines Zellsystems annehmen, die nach einem mehr oder weniger langen Zeitraum erreicht wird.

Einen wichtigen Platz nehmen die Versuche ein, die Phagozytose vor allem im Sinne der Stimulation zu beeinflussen. Dies läßt sich durch eine Reihe von Substanzen und Partikel erreichen, unter denen sich Bakterien, Endotoxine, Serumkomponenten wie Opsonine und Komplement, Stoffe pflanzlicher Herkunft, Lipide und Hormone finden (Übersicht bei VERNON-ROBERTS, 1972). In dieser Hinsicht ist ebenfalls der Effekt verschiedener physikalischer und chemischer Agentien untersucht worden (BERRY et al., 1949; WILKINSON, 1954; ASIDDAO, 1964; CARR und WILLIAMS, 1967).

Diese Arbeit befaßt sich mit dem Einfluß verschiedener Konzentrationen des nichtionischen Detergens Tween 8o auf die Phagozytose. Dabei sollte nicht nur die funktionelle Leistungsfähigkeit der phagozytierenden Zellen bestimmt, sondern auch das gestaltliche Verhalten als Folge der Detergenswirkung im einzelnen analysiert werden.

Im Gegensatz zum Vorgehen anderer Untersucher, die die Wirkung von Detergentien beim lebenden Tier verfolgt haben oder diese auf Blutzellen lediglich vor Beginn der Phagozytose einwirken ließen, haben wir versucht, den Detergentieneffekt erstmalig während der Phagozytose in der Zellkultur zu überprüfen und uns für diesen Zweck einer einheitlichen Zellpopulation von Makrophagen aus dem Mäuseperitoneum bedient.

1.2. Das System phagozytierender mononukleärer Zellen

Obwohl heute kein Zweifel besteht, daß in vitro unter bestimmten Umständen fast alle und in vivo zahlreiche Zelltypen zur Phagozytose fähig sind, gelten seit METCHNIKOFF diejenigen Zellen durch das Phänomen der Phagozytose als besonders ausgezeichnet, die schon dieser Autor "Makrophagen" genannt und in ihrer Bedeutung für die Defensivmechanismen des Organismus bereits hervorgehoben hat. Ihre Haupttätigkeit ist die Aufnahme und die intrazelluläre Verarbeitung von Stoffen, während bei dem zweiten Zellsystem mit besonderer Phagozytoseaktivität, den Leukozyten ("Mikrophagen") außerdem noch eine extrazellulär-fermentative, insbesondere histolytische und bakteriolytische Funktion im Vordergrund steht (LETTERER, 1957; GINSBURG et al., 1974).

Es hat in der Vergangenheit nicht an Versuchen gefehlt, die mononukleären Phagozyten als zu einem einzigen Zellsystem zugehörig zu betrachten. Es sei erinnert an das "Retikulo-endotheliale System" von ASCHOFF (1923) und das "Retikulo-histiozytäre System" von VOLTERRA (1927), das von THOMAS (1949) wiederaufgegriffen wurde.

Da die bisherigen Definitionen des "Makrophagensystems" von METCHNIKOFF im Lichte des heutigen Wissens unbefriedigend sind, wurden von einer internationalen Arbeitsgruppe alle hochaktiven phagozytierenden mononukleären Zellen und ihre Vorstufen zusammengefaßt und als Bezeichnung "Mononukleäres phagozytierendes System" vorgeschlagen (FURTH et al., 1972). Diese Zusammenfassung fußt auf Ähnlichkeiten in Morphologie, Funktion, Ursprung und Bewegungsform der mononukleären Zellen mit der Phagozytose als Kardinalfunktion. Dieses System umfaßt die Histiozyten, die im Blut zirkulierenden Monozyten, die Promonozyten und die Vorstufen im Knochenmark. Damit soll die myelogene Herkunft der weit im Körper verteilten, in den Organen (Leber, Milz, Lymphknoten, Lungen, Knochenmark, Nervensystem, Plazenta), im Bindegewebe und in den seriösen

Höhlen vorkommenden Gewebsmakrophagen neben der engen morphologischen und funktionellen Verwandtschaft der gesamten Zellgruppe in den Vordergrund gestellt werden. Hinzu kommt als gemeinsames Charakteristikum der reiferen Stufen dieser Zellen die Existenz von Rezeptorstellen für das F_c-Fragment des Immunglobulinmoleküls und die dritte Komplementkomponente (C3) (HUBER und WEINER, 1974). Auf Grund dieser Kriterien werden Endothelzellen und Fibroblasten sowie Fibrozyten, Retikulumzellen und dendritische Zellen in den Keimzentren der Milz- und Lymphfollikel nicht diesem System phagozytierender Zellen zugerechnet. Für die Sinusendothelien der Lymph- und Milzsinus sowie des Knochenmarks ist noch nicht genügend geklärt, ob sie die zugrunde gelegten Kriterien erfüllen und diesem Zellsystem angehören (TANAKA, 1969).

Während die morphologischen Merkmale innerhalb dieses Zellsystems bekanntermaßen stark variieren, sind es vor allem die funktionellen Eigenschaften, die sie besonders auszeichnen. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit, eine hohe Phagozytose- und Pinozytosetätigkeit zu entfalten und fest an einer Glasoberfläche zu haften (RABINOVITCH, 1968, 197o; COHN, 1968, 197o).

1.3. Herkunft, Morphologie und Funktion der Peritonealmakrophagen der Maus

Um die unverkennbaren Vorteile der Bestimmung der Phagozytoseaktivität mit der in vitro-Technik zu nutzen, die nämlich eine genauere Kontrolle und Beeinflussung der Versuchsbedingungen sowie eine Beobachtung der morphologischen Veränderungen während der Phagozytose erlaubt, wurde diese im vorliegenden Experiment an der Makrophagenpopulation aus der Peritonealhöhle der Maus untersucht. Diese stellt eine große Zahl leicht verfügbarer Zellen bereit, die im Unterschied zu den Kupffer'schen Sternzellen der Leber nicht in unmittelbarem Kontakt mit dem zirkulierenden Blut stehen und deshalb auch mit Hilfe der Clearance-Technik nicht zu untersuchen sind.

Die Peritonealmakrophagen der Maus stellen nach ihrer besonders gut untersuchten Herkunft von den zirkulierenden Monocyten des peripheren Blutes und damit von einer zellulären Vorstufe im Knochenmark (GOODMAN, 1964; VOLKMAN, 1966; VIROLAINEN, 1968), nach ihrer hohen Phagozytoseaktivität und ihrer Fähigkeit, auf einer Glasunterfläche zu haften, trotz ihrer starken morphologischen Variabilität in der Zellkultur eine homogene Zellpopulation dar, die gut von anderen Zellen unterscheidbar ist. Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, innerhalb einer Versuchsserie die einzelnen Zellkulturansätze in ihrer qualitativen Zellzusammensetzung besser konstant zu halten und reproduzierbar zu machen.

Wenn Peritonealmakrophagen der Maus durch Auswaschen der Peritonealhöhle mit Kochsalzlösung gewonnen werden, sind sie gewöhnlich annähernd rund mit einem Durchmesser von 1o bis 25 micron und einem ovalrunden, teils eingekerbten, nieren- oder hufeisenförmigen Kern, der weniger als die Hälfte des Zellvolumens einnimmt und keine Nukleolen aufweist (FURTH, 197o c). Das Zytoplasma besitzt eine deutliche Ektoplasma-

zone, ist granuliert und zeigt einige helle Vesikel. Nach Giemsa-Färbung können im Zytoplasma azurophile Granula, außerdem rosafarbene Bezirke und andere mit mehr blauer Anfärbung sichtbar werden.

Als besonders charakteristisches morphologisches Merkmal gilt die wellige Fältelung der Plasmamembran, die leicht im Phasenkontrast- und vor allem im Elektronenmikroskop erkannt werden kann, allerdings nur bei reiferen Zellen vorkommt (HIRSCH und FEDORKO, 197o; DAEMS und BREDEROO, 197o). Bei der Untersuchung von dünnen Präparationen der Peritonealmakrophagen der Maus mit dem Phasenkontrastmikroskop, also von vitalen Zellen im nativen Zustand und ohne wesentliche Artefakte, zeigen größere Zellen an ihrer Oberfläche eine Fältelung und an der äußersten Zellperipherie eine sekundäre Faltenbildung in Gestalt feiner Kräuselungen, die den Eindruck des Undulierens der Membran vermitteln. In phasenkontrast-kinematographischen Aufzeichnungen gleicht diese Membranoberfläche der Oberfläche von Wasser kurz vor dem Kochen (AMBROSE, 1964). Das Zytoplasma enthält zahlreiche kleine Granula von verschiedener Phasendichte, die offensichtlich größere Organellen darstellen. Der Makrophagenkern bietet ein gesprenkeltes Aussehen.

Ein Teil der Zellen ist dagegen nur zwischen 1o und 15 micron groß, hat einen nur mäßig breiten Zytoplasmasaum und einen runden Kern mit lockerer Chromatinstruktur und gleicht damit mittleren bis großen Lymphozyten (FURTH, 197o c). Auch elektronenmikroskopisch sind solche Zellen nicht eindeutig differenzierbar. Erst mit dem Nachweis funktioneller Äußerungen, nämlich der Haftung an Glas, der Fähigkeit zur Phagozytose und Pinozytose gelingt es, die wirklichen Phagozyten unter ihnen zu ermitteln und zu isolieren (FURTH et al., 1972).

Damit ist es auch möglich, zu Versuchszwecken eine Zellkultur aus morphologisch zwar unterschiedlichen Zellelementen herzustellen, die aber einem gemeinsamen Zellsystem von definierten Phagozyten zugehören.

1.4. Die Struktur der Peritonealmakrophagen der Maus in der Zellkultur

Die durch Auswaschen der Peritonealhöhle gewonnenen Makrophagen der Maus haben wie die Monozyten, Thrombozyten und Granulozyten des Blutes sowie die fixen Makrophagen des Gewebes die Eigenschaft, spontan Pseudopodien zu bilden, die auf festen Oberflächen haften können und sich auf diesen ausbreiten, so daß sie eine sehr dünne hyaloplasmatische Schicht bilden. Aus dieser ragt der von Granula umgebene Kern als einziger Teil der Zelle heraus. Die sehr dünne Zytoplasmaschicht erlaubt es, insbesondere mit dem Phasenkontrastmikroskop Form und Bewegung der Zytoplasmaperipherie sowie die Zellorganellen einschließlich der aufgenommenen Partikel mit großer Deutlichkeit zu beobachten, da sie sich erwiesenermaßen spontan in einer einzigen Ebene anordnen.

Bei allen Techniken, die sich dieses Phänomens bedienen, werden die Makrophagen auf einer Glasoberfläche kultiviert. Die sich dabei entwickelnde Zellform entspricht möglicherweise in etwa den Makrophagen der intersinusoidalen Gewebsspalten von Milz und Lymphknoten (CARR und CARR, 197o). Die Struktur der Peritonealmakrophagen in der Kultur variiert mit der Länge der Kulturdauer. BENNETT (1966) hat die Phasen in seinen Kulturen von Mäusemakrophagen beschrieben als (1) Adhärenz, (2) Ausbreitung und Phagozytose, (3) Mitose und (4) verlängerte Kultur.

Im Falle der Peritonealmakrophagen der Maus tritt die erste Phase innerhalb einer Stunde ein. Auch in dieser frühen Phase der Gewebskultur sind die Zellen bereits zur Phagozytose fähig, die Phagozytosekapazität ist allerdings geringer als diejenige von länger kultivierten Zellen.

Die mitotische Periode in der Kultur erstreckt sich annähernd vom vierten bis zum zehnten Tag mit dem Gipfel am siebten Tag und einer Mitoserate von o,o3 %. Vereinzelt können Mitosen jedoch auch schon in den früheren Phasen beobachtet werden.

Die Peritonealmakrophagen der Maus breiten sich im Vergleich zu Makrophagen anderer Herkunft schnell auf einer festen Unterfläche aus, besitzen aber eine niedrige Mitoserate (BENNETT, 1966). Dementsprechend fanden COHN und BENSON (1965) in Kulturen von Mäuseperitonealmakrophagen bis zu sechs Tagen zwar Mitosen, jedoch noch kein quantifizierbares Zellwachstum. Dennoch stellen unter geeigneten Bedingungen in vitro gehaltene Zellen aus der Peritonealflüssigkeit von Mäusen auch für kürzere Kultivierungszeiten das Äquivalent einer Zellkultur dar.

Die runden frisch gewonnenen Peritonealmakrophagen verändern in der Kultur sehr schnell ihre Struktur und entwickeln sich zu heterogenen Zellen, die viele Entwicklungsstadien nebeneinander erkennen lassen. Mit dem Rasterelektronenmikroskop kann man nach dem Haften der Zellen auf einer Glasoberfläche das zunehmende Auftreten von flachen runden Formen beobachten, die sich dann in flache, sternartig verzweigte Formen umwandeln (CARR und CARR, 197o). Während dieses Vorganges werden feine protoplasmatische Ausläufer gebildet. Mit der Dauer der Kultur wird die Zellform flach, rund oder gestreckt, meist sternförmig oder verästelt. Gleichzeitig zeigt die Membran im Phasenkontrastmikroskop Fältelungen und feine Kräuselungen. Bei vollständiger Ausbreitung der abgeflachten Zelle kann die Größe im Durchmesser 8o micron betragen. Manchmal sind ein oder zwei, in verschiedene Richtungen orientierte läppchenartige Zellausläufer zu beobachten, die am äußersten Ende einen welligen undulierenden Membranabschnitt aufweisen. Die Zytoplasmaperipherie solcher Zellen berührt sich gelegentlich in der Kultur (JACOBY, 1965). Aus der Verschmelzung der Zellen

sollen mehrkernige Riesenzellen entstehen können (GOLDSTEIN, 1954).

Nach Stimulierung durch chemische Substanzen oder Substanzen wie Lipopolysaccharide und Glyzerintrioleat sowie durch einfaches Wachsen in einem Kulturmedium entstehen vermehrt große Zellformen der Peritonealmakrophagen, die als Reizformen oder aktivierte Zellen betrachtet werden können und von der Art der Stimulation abhängig variierende morphologische Veränderungen aufweisen (COHN und BENSON, 1965; CARR und WILLIAMS, 1967; BRÜCHER et al., 1969; CARR und CARR, 197o; HIRSCH und FEDORKO, 197o). Diese morphologischen Veränderungen zeigen jedoch nicht das Vorliegen eines qualitativ unterscheidbaren gesonderten Zelltyps an, sondern gehen im Zuge des jeweils unerläßlichen Gestaltwandels mit der auf den Stimulus antwortenden quantitativen Funktionssteigerung einher. Diese stellt das faßbare Substrat der Aktivierung von Makrophagen dar, sie kann entsprechend den verschiedenen Arten der Stimuli in verschiedener Weise erfolgen: Erhöhung des Zellgehaltes an Eiweiß und Enzymen, Abgabe von lysosomalen Enzymen, Steigerung der Phagozytose, der Ausbreitung und Adhäsion, Hemmung des Wachstums von Tumorzellen (ALLISON und DAVIES, 1974).

Morphologisch entsprechen aktivierte Makrophagen stärker ausgereiften Zellen mit deutlicher Größenzunahme, stärker granuliertem, etwas inhomogenem Zytoplasma und deutlicher Oberflächendifferenzierung bei meist verstärkter Bewegungsaktivität und Deformierbarkeit der ganzen Zelle.

Aktivierten Makrophagen ähnlich erscheinen vielfach Zellelemente, die kleinere oder stärkere Schäden aufweisen und oftmals entstehen, wenn der Stimulus in unphysiologischem Ausmaß eingewirkt hat. Dabei kommen Bilder zustande, die der von BESSIS (1964) bezeichneten "Zellagonie" entsprechen. Eine scharfe Abgrenzung von aktivierten Zellen ist durch den gleichzeitigen Funktionsverlust gegeben. BESSIS hat die mor-

phologischen Merkmale, soweit sie Rückschlüsse auf die eingetretene Zelldegeneration erlauben, folgendermaßen zusammengestellt:

1) Das Hyaloplasma entwickelt abnorme Pseudopodien, die lang und perlschnurartig verdickt sind oder eine typische Sternform aufweisen, während das Zentrum der Zelle in erster Linie von dem Kern allein und den Organellen, die dicht um ihn gelagert sind, ausgefüllt ist. Unter der Zelloberfläche können sich ektoplasmatische Blasen bilden, wonach sich die sterbende Zelle in eine Menge kleiner Kugeln aufteilt.

2) Die Zellmembran wird schnell durchlässig für Wasser, wodurch ein Zellödem entsteht. Die Zelle rundet sich ab, die Organellen, insbesondere Lysosomen, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien vakuolisieren, so daß die Zellen ein honigwabenartiges Aussehen annehmen können. Die "Verflüssigung" des Zytoplasmas ist für das Fehlen einer koordinierten Pseudopodienbewegung und die Bildung abnormer Pseudopodien verantwortlich.

3) Am Ende steht die Plasmolyse in Analogie zur Hämolyse der Erythrozyten. Der makromolekulare Inhalt der Zelle tritt aus, aber die Organellen bleiben in der Zelle. In seltene-ren Fällen kann die Zelle auch einfach zerbersten. Manchmal mündet das Absterben der Zelle in einen gelartigen Zustand des Zytoplasmas, der die Zelle vollkommen erstarrt erscheinen läßt.

4) Durch charakteristische Vakuolenbildung der Kernmembran bilden sich zahlreiche perinukleäre Vakuolen. Der Kern selbst wird ödematös, nimmt an Volumen zu und wird rund. Das Chromatin wird homogen. Danach wird der Kern pyknotisch oder er zerbirst.

Manche Zeichen der Zellagonie können nach geringer Schädigung der Zellen auftreten, die aber nicht notwendigerweise zum Tod mit dem Verlust der Organisation der Zelle führen müssen, solange nicht der "Point of no return" erreicht ist. Erst mit ihm verläßt die Zelle die Phase der dystrophischen Degeneration mit gestörter oder verminderter Funktion und tritt wegen Nichtausreichens der zellulären Kompensationsvorgänge in das irreversible Stadium der Zellagonie ein.

1.5. Wahl der Partikel für die Phagozytose

Als Testpartikel für den Phagozytoseversuch bietet sich die am meisten für solche Zwecke benutzte kolloidale Kohle an. Kohleteilchen werden als inertes Material von Makrophagen zahlreicher Organe aufgenommen (POLICARD, 1965). Die phagozytierte Kohle ist ein bekanntes exogenes Pigment und kann besonders in der Lunge zusammen mit phagozytiertem anorganischem Material in Phagolysosomen nachgewiesen werden (NEWMAN et al., 1967). Zellen mit phagozytierter Kohle zeigen keine Merkmale einer Schädigung außer im Falle einer Überladung (MARKS et al., 1956).

Industriell hergestellte kolloidale Kohlesuspensionen sind in gut standardisierter nichttoxischer Form erhältlich. Sie enthalten Partikel gleicher Größe und werden durch Kontakt mit Blut oder Kulturmedien weder in ihren physikalischen noch chemischen Eigenschaften verändert. Nach Aufnahme durch Makrophagen sind die Kohleteilchen mikroskopisch sehr leicht im Zytoplasma sichtbar. Als stabilisierende Substanz dient bei der für Phagozytoseversuche am meisten verwendeten Tusche Gelatine, die im Gegensatz zu Schellack nicht so leicht zu einer Aggregierung der Partikel bei Anwesenheit von Serumfaktoren führen soll (ROOS, 197o).

1.6. Oberflächenaktive Substanzen und Phagozytose

In den schon länger zurückliegenden Untersuchungen von FENN (1921-1922) und PONDER (1928) wurde die Phagozytose als ein rein physikalisches Phänomen betrachtet, bei dem Oberflächenkräfte die hauptsächliche Determinante der Partikelaufnahme darstellen. Die genannten Autoren leiteten theoretische Formeln ab, nach denen die Phagozytose durch Abnahme der Oberflächenenergie der Zelle oder der Grenzflächenspannung zwischen Zelle und Partikel und durch eine Zunahme der Oberflächenenergie des Partikels begünstigt wird. Eine metabolische Energieleistung durch die phagozytierende Zelle wird dabei nicht für erforderlich gehalten.

Nach diesem Konzept sollten sich die beiden ersten Phasen der Phagozytose - die Phase der Haftung oder Fixierung des Partikels an der Zelloberfläche und die Phase der Aufnahme - passiv und analog den Randwinkelbeziehungen zwischen den Grenzflächen dreier Phasen mit verschiedener Oberflächenenergie vollziehen. Diese Beziehungen hat YOUNG (18o5) als erster entwickelt (Zusammenfassung bei MUDD et al., 1934).

BERRY et al. (1949) haben diese theoretischen Auffassungen experimentell unterbaut, indem sie die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Leukozyten in vitro nach vorangegangener Einwirkung von zahlreichen verschiedenen oberflächenaktiven Substanzen bestimmten und dabei zu Ergebnissen gekommen sind, die den physikalischen Überlegungen entsprachen. Nach ihren Untersuchungen ändert sich die Phagozytose nicht, wenn Partikel und Zellen gleichzeitig mit Detergentien inkubiert werden. Dies wird damit erklärt, daß die Oberflächenspannung von Partikeln und Zellen gleichzeitig proportional verringert wird. Dem steht entgegen, daß die Oberflächenspannung von Zellen bereits sehr niedrig ist und nur o,1 bis 1 dyn/cm beträgt (MALHOTRA und HARREVELD, 1968). Sie dürfte durch oberflächenwirksame Mittel kaum noch wesentlich zu erniedrigen sein.

Dagegen sind die Energieabhängigkeit der Phagozytose (BALDRIDGE und GERARD, 1933) und deren Abhängigkeit von einem Milieu, das vor allem hinsichtlich der Ionenkonzentration und Temperatur für Lebensprozesse geeignet ist, in den Vordergrund zu rücken. Die Untersuchungen von SBARRA und KARNOVSKY (1959) über die Phagozytoseaktivität von Leukozyten und mononukleären Zellen in Gegenwart von die Zellatmung blockierenden Substanzen, von GORDON und KING (1960) sowie von MASSHOFF und OEHLER (1965) über ein vollständiges Sistieren der Partikelaufnahme bei niedrigen Temperaturen, ferner die Studien von NORTH (1968) über die phagozytosesteigernde Wirkung von ATP im Inkubationsmedium von Meerschweinchenmakrophagen haben deutlich gemacht, daß der Ablauf der Phagozytose von bestimmten metabolischen Vorgängen begleitet wird und diese sogar erfordert. SBARRA und KARNOVSKY (1959) haben nachweisen können, daß die Aufnahme fester Partikel sehr empfindlich auf die Anwesenheit von Inhibitoren der Glykolyse im Sinne einer Herabsetzung reagiert. Seither hat sich eine große biochemische Heterogenität phagozytierender Zellen herausgestellt (COHN und MORSE, 1960; KARNOVSKY, 1962; OREN et al., 1963). Die wesentliche Rolle der aktiven Zelleistung bei der Phagozytose geht schließlich aus der elektronenmikroskopischen sichtbaren Vermehrung und Vergrößerung der Lysosomen während der Phagozytose hervor (COHN et al., 1966 a; 1966 b; SUTTON und WEISS, 1966), die mit der Phagozytosevakuole durch Fusion zu einem gemeinsamen Phagolysosom in Beziehung treten (DE DUVE und WATTIAUX, 1966).

Nach Vorstellungen von ALLISON et al. (1971) besteht der normale Stimulus für die Endozytose in der Bindung von Immunglobulinen an Rezeptoren der Membranoberfläche, die dem Immunglobulin nach einem Wechsel seiner Konfiguration durch Kontakt mit dem Antigen möglich ist. Dieser Bindung soll möglicherweise durch Zusammendrängung der Membranproteine die Bildung von das Plasmalemm durchquerenden Kanälchen folgen, die den Eintritt von Calcium-Ionen in die Zelle ermöglichen. Die dadurch veranlaßte Kontraktion von Aktomyosin-Filamenten im Ektoplasma soll zu der die Phagozytose einleitenden morphologischen Ober-

flächendifferenzierung der Membran führen. Auch SINGER und NICOLSON (1972) interpretieren Versuche über die Pinozytose in der Weise, daß ein Zusammendrängen von Immunglobulinen an der Membran die Pinozytose auslöst.

ASIDDAO et al. (1964) haben die Phagozytoseaktivität der Kupffer'schen Sternzellen der Leber unter Benutzung einer mit oberflächenaktiven Substanzen versetzten Suspension kolloidaler Kohle bestimmt, um die FENN'sche Hypothese über den Einfluß der Wirkung von Oberflächenkräften auf die Phagozytose zu testen. Dabei hat sich gezeigt, daß bei einer Konzentration von 5×10^{-3} % Tween 80 die Kohle-Clearance innerhalb kurzer Zeit vermindert, bei der schwächeren Konzentration von 5×10^{-4} % die Eliminierung von Kohle und damit die Phagozytoseleistung erhöht wird.

Nach intravenöser Gabe von Detergentien (LOUD und SCHAUB, 1959; BACCINO, 1962; NOVIKOFF und ESSNER, 1962; WATTIAUX, 1963; LOUD und PACK, 1965) sind unmittelbare Einwirkungen von oberflächenaktiven Substanzen auf die Zellfunktionen nachweisbar. Diese bestehen vor allem in einer Erhöhung des Wasser- und Neutralfettgehaltes der Zellen sowie einer Auftreibung und Schwellung des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien, deren Außenmembran fragmentiert wird. Ein wesentlicher Befund ist die Entstehung großer vakuolärer Bildungen, die offensichtlich Lysosomen und möglicherweise degenerierte Mitochondrien darstellen. Diese sind nicht nur in Leberzellen nachzuweisen, sondern können auch die fixen Gewebsmakrophagen der Leber, die Kupffer'schen Sternzellen, fast vollständig ausfüllen.

Nach Beobachtungen von GRAHAM et al. (1967) über den metabolischen und morphologischen Effekt oberflächenaktiver Stoffe auf Leukozyten ist bei Einwirkung von Digitonin und Desoxycholat die Zellatmung stark erhöht. Substanzen wie Tween 80 und Triton X-100 dagegen haben keinen wesentlichen Effekt. Ultra-

strukturelle Veränderungen der Zelloberfläche konnten lediglich nach Inkubation mit Digitonin in Form zylindrischer Vorwölbungen der Zellmembran festgestellt werden.

Allgemein wird angenommen, daß Detergentien auf die Lipide sowohl der Zellwand als auch der cytoplasmatischen Membranen einwirken und deren Durchlässigkeit erhöhen. Saponin, ein dem Digitonin verwandtes oberflächenaktives Agens, soll auf die lamellär geordneten Komponenten der Zellmembran in der Weise einwirken, daß diese sich mizellär umwandeln (BANGHAM et al., 1962). NERMUT (1964) hat durch elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt, daß unter Einwirkung der Detergentien Natriumlaurylsulfat und Desoxycholat in Abhängigkeit von Inkubationsdauer und Konzentration die Oberflächenmembranen von Penicillinsphäroblasten in globuläre Gebilde verschiedener Größe zerfallen und die Zellwände von Proteus sich ähnlich verhalten.

GLAUERT et al. (1962), LUCY und GLAUERT (1964), GLAUERT und LUCY (1968) haben das Konzept der Umstrukturierung der bimolekularen Lipoidmittelschicht der Membran durch oberflächenaktive Verbindungen zu globulären Mizellen erweitert und mit verschiedenen Funktionszuständen der Membran in Verbindung gebracht. SEUFERT (1965) beobachtete ein konzentrationsabhängiges Absinken des Membranwiderstandes von Lipiddoppelschichten durch Detergentien und erklärt diese durch eine lokalisierte Umwandlung der lamellären Membranstruktur zu Lipidmizellen. SEUFERTs Hypothese zufolge entstehen hierbei selektiv kationendurchlässige Poren in der Membran. Er folgert weiter, daß Proteine auf Grund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften in der Lage sind, die Molekülkonfiguration der Lipidschicht der Zellmembran in ähnlicher Weise zu modifizieren wie es für Detergentien angenommen wird. Dabei soll die Zellmembran einen bestimmten Funktionszustand erhalten, indem durch die spezielle Lipid-Protein-Interaktion Kanäle in den Zellmembranen entstehen.

Die Modifizierung von Membrankomponenten im molekularen Bereich durch die Einwirkung von Detergentien hat als Effekt eine "Lockerung" bis zu einer stärkeren Desorganisation und sogar Denaturierung der Membranen zur Folge. Dabei tritt in verschiedenem Maße eine Solubilisierung und nachfolgende Extraktion von Membranbestandteilen ein (WALLACH, 1972). Neben diesen bis zur Schädigung reichenden Effekten haben oberflächenaktive Verbindungen offenbar auch die Fähigkeit zur Aktivierung der Membran von Makrophagen und ihrer Enzyme (ALLISON, 1969). Vieles spricht dafür, daß vor allem oberflächenaktive Substanzen beziehungsweise sogenannte "lysosome labilizer agents" (SPITZNAGEL und ALLISON, 197o a, b) einen Adjuvans-Effekt besitzen, wobei dies mit ihrer Fähigkeit in Zusammenhang stehen soll, Zellmembranen zu verändern.

Mit Lysolecithin, das über eine starke Oberflächenaktivität und gleichzeitig eine gute Adjuvanswirkung verfügt, konnte eine Steigerung der Phagozytose bei Anwendung kleinster Mengen erreicht werden (BURDZY et al., 1964). MUNDER et al. (197o) haben gezeigt, daß bekannte, selbst keine Oberflächenaktivität aufweisende Adjuvantien wie das komplette Freund'sche Adjuvans einerseits den Phospholipidstoffwechsel der Makrophagen deutlich beeinflussen, andererseits eine Anhäufung von hochgradig oberflächenaktiven Verbindungen wie beispielsweise Lysophosphaten und hydrolysierten Fettsäuren in den Zellen bewirken, also indirekt einen oberflächenaktiven Effekt an den Zellmembranen herbeiführen.

1.7. Wahl der oberflächenaktiven Substanz

Für den Versuch, die Phagozytose durch eine oberflächenaktive Substanz zu beeinflussen, ist deren definierte und einfache chemische Zusammensetzung sowie ein hoher Reinheitsgrad von Vorteil. Dies trifft für die synthetischen Detergentien zu, die sich in an-, kat- und nichtionische sowie amphotere Verbindungen aufteilen. Von diesen sind die nichtionischen Detergentien die Verbindungen, die nur einen geringen Einfluß auf Eiweißkörper haben (PUTNAM, 1948; KLINGMÜLLER und SCHROEDER, 1953) und die geringsten schädigenden und denaturierenden Effekte auf lebende Zellen ausüben (LIEGL, 197o).

Bezüglich der neutralen nichtionogenen Detergentien besteht die Vorstellung, daß sie nur eine limitierte Wechselwirkung auf Proteine in der Weise ausüben, daß sie an der Oberfläche der Proteine gebunden werden, ohne extensive Änderungen der Molekülstruktur herbeizuführen (DOWBEN und KOEHLER, 1961; KOEHLER und DOWBEN, 1961).

Von den zahlreichen kommerziell erhältlichen Substanzen wurde Tween 8o als Vertreter der nichtionogenen grenzflächenwirksamen Verbindungen gewählt, ein Polyoxyäthylen-Sorbit-Monooleat. Wie bei allen Detergentien istsein Molekül asymmetrisch gebaut. Es besteht aus einer polaren hydrophilen Gruppe ohne Gegenion (Polyoxyäthylenkette) sowie einer apolaren hydrophoben Gruppe (Kohlenwasserstoffkette). Diese bewirken jeweils die bevorzugt orientierte Adsorption in den Grenzflächen, welche eine wäßrige Lösung mit anderen Phasen bildet. Infolge dieser Adsorption verändert es die Grenzflächeneigenschaften, wobei die starke Erniedrigung der Grenzflächenspannung am sinnfälligsten ist (KLING, 1953). Bei Tween 8o ist die Wirkung beider Gruppen etwa gleich stark, so daß eine sehr gute Wasserlöslichkeit besteht.

2. Material und Methodik

2.1. Isolierung der Zellen

Für die Versuche werden NMRI-Mäuse mit einem Durchschnittsgewicht von 2o $\pm$ 2 g verwendet, die Tiere mit Altromin und Wasser ernährt. Je drei Tiere bilden eine Versuchsgruppe. Die Zellen aus dem Peritonealraum werden in gering modifizierter Weise nach der von ROWLEY und WHITBY (1959) angegebenen Methode gewonnen.

Jedes Tier erhält intraperitoneal 1o ml des Mediums RPMI 164o der Fa. Biocult (Glasgow) mit einem pH von 7,2. Nach vorsichtiger Massage der Bauchdecken von zwei bis drei Minuten werden bei maximaler Aspiration ca. 8 ml einer zellhaltigen Flüssigkeit aus der Peritonealhöhle eines jeden Tieres abgesaugt. Das Punktat enthält durchschnittlich 6 - 1o x $1o^6$ Zellen/ml (Zählung in der Zählkammer nach Neubauer). Anschließend Zentrifugation des Punktates bei 8oo RPM und 6^o C für 2o Minuten, Abpipettieren der überstehenden Flüssigkeit, Resuspension der sedimentierten Zellen mit ca. 8 ml des o.a. Mediums pro Röhrchen. Zellkonzentration danach 2 x $1o^6$ /ml.

Die Differentialzellzählung des nach Giemsa gefärbten Ausstriches ergibt 98 % mononukleäre Zellen. 5o - 6o % sind klein, nahezu rund und monocytenähnlich mit angedeutet nierenförmigem Kern, der Rest besteht aus lymphoiden Zellen. 2 % der Zellen sind Granulozyten sowie einzelne Mastzellen und degenerierte Mesothelien.

2.2. Herstellung einschichtiger Deckglaskulturen

Die Zellkulturen werden nach einer abgewandelten Methode von MICHELL et al. (1969) in runden Plastik-Kulturschälchen der Fa. Difco hergestellt (Durchmesser 35 mm, Höhe 1o mm). Nach Vorwärmung von 37° C wird auf den Boden eines jeden Schälchens ein Deckglas (Größe 28 x 28 mm) gelegt und anschließend mittels einer Pipette mit 2 ml Zellsuspension gefüllt. Die Schälchen werden vorsichtig alle paar Minuten bewegt, insgesamt 3o Minuten bei 37° C belassen und während dieser Zeit mit Preßluft und 5 % CO_2 begast. In dieser Zeit entsteht eine festhaftende Zellschicht auf der Deckglasoberseite. Danach wird das Medium (RPMI) abgesaugt, die Deckgläser werden mit den haftenden Zellen drei- bis sechsmal bei Raumtemperatur in physiologischer Kochsalzlösung gespült und mit der Zellschicht nach oben in neue Plastikschälchen gelegt. Damit ist die Präparation für die Phagozytoseversuche in der Zellkultur abgeschlossen. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen stellen überwiegend eine homogene Population junger mononukleärer Phagozyten dar, daneben sind ganz vereinzelt reifere Zellformen und gelapptkernige Granulozyten zu finden. Letztere verschwinden mit der Dauer des Kulturversuches vollständig, indem sie sich auflösen oder phagozytiert werden.

Nach Abtropfen des Restmediums durch Schrägstellen der Deckgläser wird die jeweilige Versuchslösung mit einer Pipette in die Plastikschale und auf das darin liegende Deckglas mit der an der Oberseite haftenden Zellschicht gegeben, die Menge beträgt 2 ml je Schälchen.

2.3. Herstellung der Tuschelösung

Alle Phagozytoseversuche werden mit der gleichen Tuschekonzentration in der Versuchslösung durchgeführt. Dazu wird an jedem Versuchstag von einer Stamm-Suspension kolloidaler Kohle (unverdünnte Tusche C11/1431 a, Pelikan-Werke, Hannover) eine 2oo-fache Verdünnung hergestellt, indem o,5 ml dieser Tusche zu 99,5 ml Medium gegeben werden, das die gleiche Zusammensetzung aufweist wie das zum Auswaschen der Peritonealhöhle benutzte. Zur Beschickung von jeweils 1o Kulturschälchen mit reiner Tuschelösung und zur Herstellung der Tween 8o-Tusche-Lösungen wird 1 ml der o,5 %igen Tuschelösung mit weiteren 19 ml des o.a. Mediums verdünnt, so daß sich eine o,o25 %ige Verdünnung der Ausgangssuspension ergibt.

2.4. Herstellung der Tween 8o-Tusche-Lösung

Fünf Tween 8o-Tusche-Lösungen verschiedener Konzentration werden hergestellt.

Lösung 1: 2 ml Tween 8o (zur Synthese, Fa. Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München) werden mit 18 ml o,o25 %iger Tusche-Suspension gut vermischt. Von dieser Lösung wird o,5 ml mit weiteren 9,3 ml o,o25 %iger Tusche-Suspension vermischt. Diese Mischung stellt die fertige Lösung 1 dar, sie entspricht einer Tween 8o-Konzentration von o,5 %.

Lösung 2 stellt die 1o-fache Verdünnung der Lösung 1 dar und weist eine Tween 8o-Konzentration von $o,5 \times 1o^{-1}$ % auf. Durch weitere Verdünnungen der vorangehenden Lösung um den Faktor 1o entstehen die Lösungen 3 bis 5. Lösung 3 hat demnach die Tween 8o-Konzentration von $o,5 \times 1o^{-2}$ %, Lösung 4 von $o,5 \times 1o^{-3}$ %, Lösung 5 von $o,5 \times 1o^{-4}$ %.

Die Tusche-Konzentration in den Lösungen 1 bis 5 beträgt o,o25 %.

2.5. Durchführung der Versuche

Nach der Inkubation von jeweils 5 einschichtigen Deckglaskulturen mit der Tween 8o-freien Tusche-Kontrollösung und den Lösungen 1 bis 5 für 1o, 2o, 6o und 12o Minuten bei 37° C und Begasung mit Luft-CO_2-Gemisch werden die Deckgläser mit der auf ihnen haftenden Phagozytenschicht vorsichtig aus den Plastikschälchen entnommen. Durch eine schnelle drei- bis sechsmalige Waschung mit physiologischer Kochsalzlösung werden die Präparate von den nicht phagozytierten und eventuell nur locker den Zellen angelagerten Partikeln befreit. Anschließend werden entweder Vaseline-umrandete Frischpräparate für die Phasenkontrastuntersuchung oder nach Fixierung im Äther-Alkohol-Gemisch und mit HE oder Gallocyanin gefärbte, in Caedax eingedeckte Präparate hergestellt.

2.6. Auswertung

In jedem gefärbten Präparat werden mindestens 3oo Zellen in durchschnittlich 2o verschiedenen Gesichtsfeldern mit Ölimmersion (12oo-fache Vergrößerung) ausgezählt. Dabei wird die Anzahl der phagozytierenden Makrophagen bestimmt. Der prozentuale Anteil der phagozytoseaktiven Makrophagen an der Gesamtzahl der ausgezählten Zellen ergibt die Phagozytoserate während einer bestimmten Zeitperiode.

Es wurde davon abgesehen, den Phagozatoseindex, d.h. die Anzahl der phagozytierten Teilchen je Zelle zu bestimmen nach einer Technik, die von HAMBURGER (1912) eingeführt wurde und die dadurch etwas verbessert werden kann, daß das Verhältnis von Zellen mit einer bestimmten Anzahl aufgenommener Partikel festgestellt wird. Jedoch erweist sich diese Methode als sehr stark von subjektiven Faktoren abhängig und ungeeignet für grö-

ßere Untersuchungsreihen. Außerdem stehen Phagozytoserate und Phagozytoseindex in einer engen Korrelation zueinander (HAMBURGER, 1912), so daß die Bestimmung der Phagozytoserate als völlig ausreichend erscheint.

Eine Kontrolle der Zählungen durch Trübungsmessungen der Suspensionen ist wegen des geringen Zellgehaltes einschichtiger Zellkulturen und der entsprechend geringen Abnahme des Tuschegehaltes der Suspensionen nach relativ kurzer Phagozytosedauer nicht durchführbar.

Von den Vitalpräparaten wurden im Phasenkontrastmikroskop Photogramme (Agfaortho 25) bei 4oo-facher Vergrößerung angefertigt (Zeiss Ultraphot 4).

3. Ergebnisse

3.1. Die Phagozytoserate unter Einfluß von Tween 8o

Die nach einer Inkubationszeit von 1o, 2o, 6o und 12o Minuten gemessenen Phagozytoseraten sind getrennt für die Tuschelösung als Kontrollen sowie für die Tween-Tusche-Lösungen 1 bis 5 in Tabelle 1 aufgeführt.

Inkubationszeiten von nur 5 Minuten haben wegen der zu geringen Zahl phagozytierender Zellen nicht zu einem verwertbaren Ergebnis geführt.

Da nach einer Inkubationszeit von 2o Minuten die Phagozytoserate ihren Höhepunkt erreicht, konnte angenommen werden, daß sich in diesem zeitlichen Bereich Unterschiede in den Werten bei den verschiedenen Inkubationslösungen am ehesten bemerkbar machen. Deshalb wurde auf diesen Inkubationszeitpunkt das Hauptgewicht gelegt, um genügend vergleichbare Resultate zu erhalten. Die unterschiedliche Länge der einzelnen Zahlenreihen (s. Tab. 1) ist auf das Mißlingen einzelner Präparationen und auf verschiedentlich mehrfache Kontrolluntersuchungen zu beziehen.

Es wurden Untersuchungen mit den Lösungen 1 und 3 nach einer Inkubationszeit von 6o Minuten angeschlossen, um festzustellen, ob sich die nach 2o Minuten ermittelte Herabsetzung bzw. Steigerung der Phagozytoserate auch zu diesem Zeitpunkt im Vergleich mit der Kontrollösung noch nachweisen lassen.

Die Untersuchungen nach 12o Minuten betreffen die Frage, ob die Lösung 3 im Vergleich zu der Kontrollösung und den Lösungen 4 und 5 auch dann noch andere Werte ergibt, wenn die Phagozytosetendenz in der Zellkultur sich dem Abschluß nähert und in den Bereich der oberen Grenze gelangt.

Tabelle 1

Phagozytoseraten für die verschiedenen Inkubationszeiten bei Verwendung von Inkubationslösungen mit verschiedener Tween 8o-Konzentration und bei den Kontrollen

Inkubations-dauer	Kontroll-lösung	Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	Lösung 4	Lösung 5
1o Min.	13,9	4,5	9,8	16,6	13,3	21,4
	8,o	7,2	8,o	1o,7	3o,9	11,8
	22,4	9,2	2,5	9,5	9,o	11,4
	27,6	12,6	22,o	6,5	24,o	14,4
	33,4	33,5	3o,o	19,1	21,1	
	14,4		4,o	71,8		
	22,4					
2o Min.	41,1	22,6	26,2	53,3	31,4	22,o
	34,4	19,3	8,7	26,5	15,8	23,3
	54,o	2o,o	12,o	21,5	43,o	35,2
	28,o	13,7	12,o	46,5	17,8	19,6
	13,6	14,8	26,o	54,2	41,o	26,4
	11,o	13,2	2o,4	36,7	54,1	28,7
	36,1	18,3	11,9	39,o	38,9	43,2
	36,1	17,7	2o,9	45,o	48,1	37,9
	31,5	2o,2	15,6	42,9	33,8	55,2
	22,9			64,2	4o,5	35,3
	45,7					
	4o,o					
	32,o					
	39,4					
	39,2					
	31,5					
	42,3					
	31,2					
	45,3					
	33,1					
6o Min.	52,3	4,7		56,2		
	12,4	19,o		64,o		
	19,6	27,5		67,8		
	42,o			52,6		
	35,o			49,9		
12o Min.	67,8			82,2	78,9	67,2
	64,4	nicht	nicht	57,6	63,1	65,6
	62,9	meßbar	meßbar	81,o	85,7	78,o
	8o,o			83,o		
	86,4					
	67,1					
	86,5					
	79,8					

Die Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung (2s) der einzelnen Bestimmungen gehen aus Tabelle 2 hervor.

Für die statistische Berechnung wurde wegen des kleinen Umfanges der Stichproben und wegen der Unsicherheit, ob die Voraussetzung der Normalverteilung gegeben ist, nicht der t-Test, sondern der Wilcoxon-Test für 2 Stichproben angestellt.

Tabelle 2

Mittelwerte der Phagozytoseraten mit Standardabweichung (2s)

Inkubationsdauer	Kontrolllösung	Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	Lösung 4	Lösung 5
1o Min.	2o,3 ±3,3	13,4 ±5,2	12,7 ±4,5	22,4 ±1o,o	19,7 ±3,9	14,8 ±2,3
2o Min.	34,4 ±2,3	17,8 ±1,1	17,1 ±2,2	43,o ±4,1	36,4 ±3,9	32,7 ±3,5
6o Min.	32,3 ±7,3	17,1 ±6,7		58,1 ±3,4		
12o Min.	74,4 ±3,5	nicht meßbar	nicht meßbar	76,o ±6,1	75,9 ±6,7	7o,3 ±3,9

Wilcoxon-Test für zwei Stichproben

1. Inkubationszeit 1o Minuten
   (Lösungen 1 bis 5 gegen Kontrolle)

	Lösg. 1	Kontrolle
1	4,5	
2	7,2	
		8
4	9,2	
5	12,6	
		13,9
		14,4
		22,4
		22,4
		27,6
		33,4
12	33,5	

$\sum T_i = 24$
$n_1 = 5$
$n_2 = 7$
$2\alpha >$ 1o %

	Lösg. 2	Kontrolle
1	2,5	
2	4	
3	8	
		8
5	9,8	
		13,9
		14,4
8	22	
		22,4
		22,4
		27,6
12	3o	
		33,4

$\sum T_i = 31$
$n_1 = 6$
$n_2 = 7$
$2\alpha >$ 1o %

	Lösg. 3	Kontrolle
1	6,5	
		8
3	9,5	
4	1o,7	
		13,9
		14,4
7	16,6	
8	19,1	
		22,4
		22,4
		27,6
		33,4
13	71,8	

$\sum T_i = 36$
$n_1 = 6$
$n_2 = 7$
$2\alpha >$ 1o %

	Lösg. 4	Kontrolle
		8
2	9	
3	13,3	
		13,9
		14,4
6	21,1	
		22,4
		22,4
9	24	
		27,6
11	3o,9	
		33,4

$\sum T_i = 31$
$n_1 = 5$
$n_2 = 7$
$2\alpha >$ 1o %

Lösg. 5 Kontrolle

		8
2	11,4	
3	11,8	
		13,9
5	14,4	
		14,4
7	21,4	
		22,4
		22,4
		27,6
		33,4

$\sum T_i = 17$
$n_1 = 4$
$n_2 = 7$
$2\alpha > 10\ \%$

---

2. Inkubationszeit 2o Minuten

Lösg. 1 Kontrolle

		11
2	13,2	
		13,6
4	13,7	
5	14,8	
6	17,7	
7	18,5	
8	19,3	
9	2o,o	
1o	2o,2	
11	22,6	
		22,9
		28
		31,1
		31,5
		31.5
		32
		33.1
		34,4
		36,1
		36.1
		39,2
		39,4
		4o
		41,1
		42,3
		45,3
		45,7
		54

$\sum T_i = 62$
$n_1 = 9$
$n_2 = 2o$
$2\alpha < 1\ \%$

Lösg. 2 Kontrolle

1	8,7	
		11
3	11,9	
4	12,o	
5	12,o	
		13,6
7	15,6	
8	2o,4	
9	2o,9	
		22,9
11	26,o	
12	26,2	
		28

.
.
.
.
.
.
.
.

$\sum T_i = 6o$
$n_1 = 9$
$n_2 = 2o$
$2\alpha < 1\ \%$

Lösg. 3 Kontrolle

	11
	13,6
3	21,5
	22,9
5	26,5
	28
	31,2
	31,5
	31,5
	32
	33,1
	34,4
	36,1
	36,1
15	36,7
16	39,o
	39,2
	39,4
	4o
	41,1
	42,3
22	42,9
23	45
	45,3
	45,7
26	46,5
27	53,3
	54
29	54,2
3o	64,2

$\sum T_i = 196$
$n_1 = 1o$
$n_2 = 2o$
$2\alpha < 1o\ \%$

Lösg. 4 Kontrolle

	11
	13,6
3	15,8
4	17,8
	22,9
	28
	31,2
8	31,4
	31,5
	31,5
	32
	33,1
13	33,8
	34,4
	36,1
	36,1
17	38,9
	39,2
	39,4
	4o
21	4o,5
22	41,o
	41,1
	42,3
25	43,o
	45,3
	45,7
28	48,1
	54
3o	54,1

$\sum T_i = 171$
$n_1 = 1o$
$n_2 = 2o$
$2\alpha > 1o\ \%$

Lösg. 5 Kontrolle

	11
	13,6
3	19,6
4	22,o
	22,9
6	23,3
7	26,4
	28
9	28,7
	31,2
	31,5
	31,5
	32
	33,1
	34,4
16	35,2
17	35,3
	36,1
	36,1
2o	37,9
	39,2
	39,4
	4o
	41,1
	42,3
26	43,2
	45,3
	45,7
	54
3o	55,2

$\sum T_i = 138$
$n_1 = 1o$
$n_2 = 2o$
$2\alpha > 1o\ \%$

3. Inkubationszeit 6o Minuten

	Lösg. 3	Kontrolle
		12,4
		19,6
		35,o
		42,o
5	49,9	
		52,5
7	52,6	
8	56,2	
9	64,o	
1o	67,8	

$\sum T_i = 39$

$n_1 = 5$

$n_2 = 5$

$2\alpha < 5\ \%$

---

4. Inkubationszeit 12o Minuten

	Lösg. 3	Kontrolle
1	57,6	
		62,9
		64,4
		67,1
		67,8
		79,8
		8o,o
8	81,o	
9	82,2	
1o	83,o	
		86,4
		86,5

$\sum T_i = 28$

$n_1 = 4$

$n_2 = 8$

$2\alpha > 1o\ \%$

Die Abbildung 1 und die Säulendiagramme der Abbildungen 2 bis 5 geben die Ergebnisse der Tabelle 2 graphisch wieder.

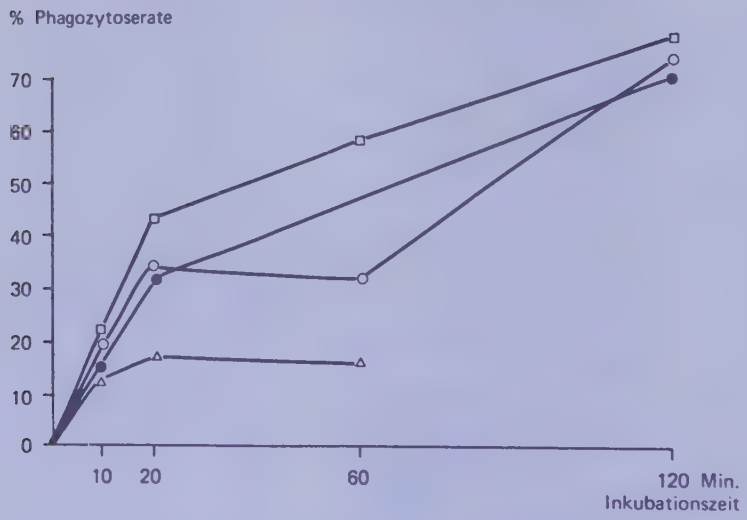


Abbildung 1 Zeitabhängiger Verlauf der Phagozytoserate (Mittelwerte) von Mäuseperitonealmakrophagen unter dem Einfluß von Tween 8o-haltigen Lösungen

o——o Kontrollösung ohne Tween 8o
Δ——Δ Lösung 1 (o,5 % Tween 8o)
□——□ Lösung 3 (o,5 x $1o^{-2}$ % Tween 8o)
●——● Lösung 5 (o,5 x $1o^{-4}$ % Tween 8o)

Tuschekonzentration in allen Lösungen o,o25 %.
Phagozytoserate für Lösung 2 und 4 der besseren Übersichtlichkeit wegen weggelassen (ähnlicher Verlauf wie bei Lösung 1 bzw. 5)
Die Phagozytoserate bei Lösung 1 ergibt bei einer Inkubation über 6o Minuten keine verwertbaren Ergebnisse.

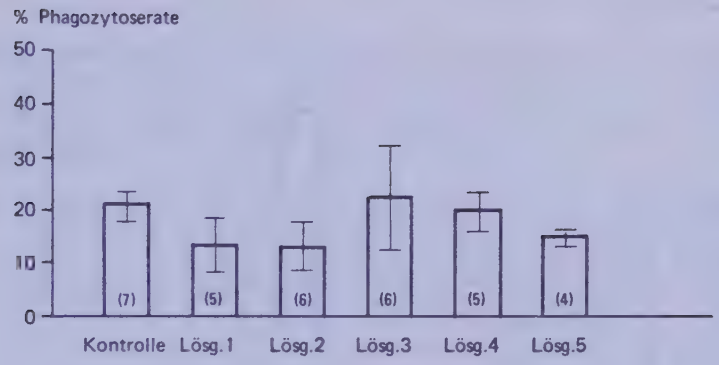


Abb. 2: Phagozytoserate (Mittelwerte ± Standardabweichung von Makrophagenpräparationen bei verschiedenen Inkubationslösungen nach einer Inkubation von 10 Minuten.) Zusammensetzung der Lösungen wie beschrieben. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der ausgewerteten Versuche an.

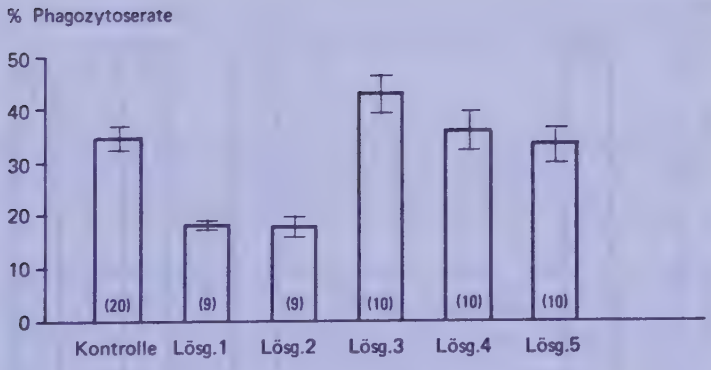


Abb. 3: wie Abbildung 2, Inkubationszeit 20 Minuten.

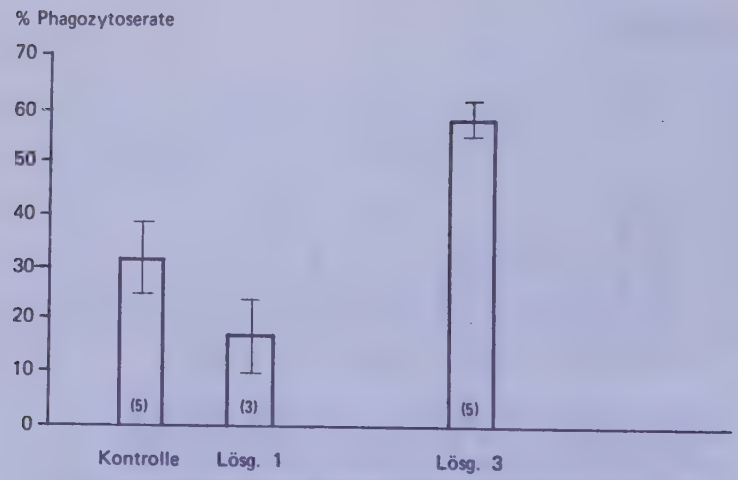


Abb. 4: Phagozytoserate nach 60 Minuten Inkubation in Kontrollösung, Lösung 1 und Lösung 3.

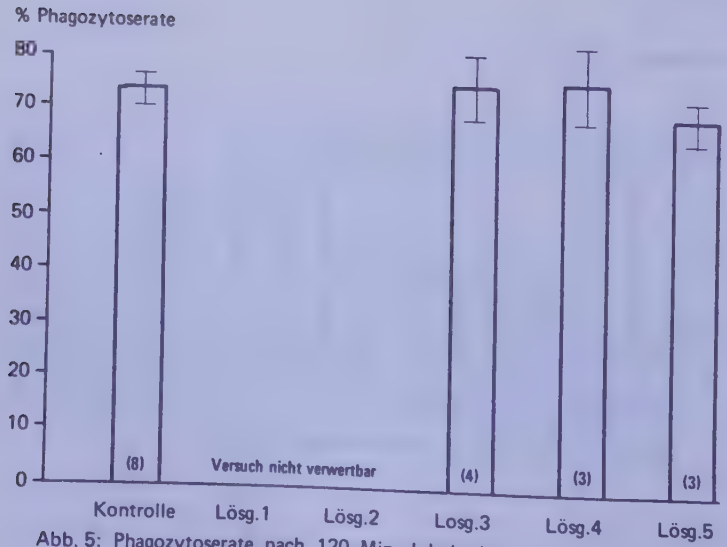


Abb. 5: Phagozytoserate nach 120 Min. Inkubation.

Aus den Tabellen 1 und 2 sowie nach dem Wilcoxon-Test ergibt sich folgendes:

1. Die Phagozytoserate nach einer Inkubation von 1o Minuten ist bei Einsatz der Lösungen 1 bis 5 mit Tween 8o gegenüber der Kontrollösung ohne Tween 8o nicht signifikant verschieden.

2. Während einer Inkubation von 2o Minuten zeigen die Lösungen 1, 2 und 3 in der Zellkultur einen Effekt auf die Phagozytoserate (Abbildungen 1 und 3, Wilcoxon-Test S.28-29). Die Lösungen 1 und 2 mit einer Tween 8o-Konzentration von o,5 % und o,5 x $1o^{-1}$ % setzen die Phagozytoserate gegenüber der Kontrollösung herab ($p < o,o1$). Die Lösung 3 mit einer Tween 8o-Konzentration von o,5 x $1o^{-2}$ % erhöht die Phagozytoserate gegenüber derjenigen der Kontrollösung während der gleichen Zeitraumes ($p < o,1$). Die Lösungen 4 und 5 mit einer Tween 8o-Konzentration von o,5 x $1o^{-3}$ % bzw. o,5 x $1o^{-4}$ % zeigen wieder hinsichtlich der Phagozytoserate keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollösung (Abbildungen 1 und 3, Wilcoxon-Test S. 29).

3. Der die Phagozytoserate steigernde Effekt der Lösung 3 läßt sich ebenfalls während einer Inkubationsdauer von 6o Minuten nachweisen ($p < o,o5$) (Abbildungen 1 und 4, Wilcoxon-Test S. 3o).

4. Nach einer Inkubation von 12o Minuten ist die Phagozytoserate in der Lösung 3 wieder gleich derjenigen in der Kontrollösung (Abbildungen 1 und 5, Wilcoxon-Test S. 3o).

5. Die Phagozytoseraten der Lösungen 1 und 2 sind wegen herabgesetzter Haftfähigkeit der Zellen bei einer Inkubation von 6o Minuten nur mit Einschränkung und wegen vollständig aufgehobener Haftfähigkeit nach 12o Minuten überhaupt nicht verwertbar.

3.2. Morphologisches Verhalten der Zellen in der Kultur nach Einwirkung von Lösungen mit und ohne Tween 8o

3.2.1. Differenzierungsvorgänge der Zellen in den Deckglaskulturen

In Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation und der Konzentration der Lösungen lassen sich während der bis zu 12o Minuten dauernden Versuche regelmäßig typische Entwicklungsstufen der auf der Glasfläche haftenden Peritonealmakrophagen erkennen. Diese sind durch das quantitativ unterschiedliche Auftreten verschiedener morphologisch, färberisch und auf Grund ihrer Bewegungsaktivität definierbarer Zelltypen charakterisiert (ROOS, 197o).

Gelapptkernige Granulozyten erscheinen nur zu Beginn in einem sehr geringen Prozentsatz in der Zellkultur. Mit fortschreitender Züchtung verschwinden sie aus der Deckglaskultur vollständig infolge ihrer kurzen Lebensdauer einerseits und der Phagozytose absterbender Elemente durch die Makrophagen andererseits. Soweit eine exakte Aussage möglich ist, phagozytieren die Granulozyten deutlich weniger Tuschepartikel als die Peritonealmakrophagen.

In der Deckglaskultur lassen sich nach 2o-minütiger Exposition folgende Zelltypen unterscheiden (Abb. 6):

1. mittelgroße und größere lymphoide Zellen, bei denen die Größe des runden mäßig chromatindichten Kernes mindestens zwei Drittel der Zelle einnimmt (Abb. 6 a),
2. lymphomonocytoide Elemente: sie sind rund bis oval, nach längerer Kultur teils etwas spindelförmig gestaltet und besitzen einen großen, etwas exzentrisch liegenden rundlichen Kern, dessen Größe die Hälfte des Zellquerschnittes erreicht oder sogar etwas übertritt (Abb. 6 b),
3. monocytoide Zellen mit nieren- bis hufeisenförmigem oder rundlichem Kern, die weitgehend den Blutmonocyten gleichen (Abb. 6 c),

4. reife und aktivierte Zellformen: sie unterscheiden sich eindeutig von den relativ kugeligen Zellen, wie sie nach Auswaschen der Peritonealhöhle auftreten; wahrscheinlich stehen sie den phagozytierenden mononukleären Zellen in Gewebespalten nahe (Abb. 6 d). Das Zytoplasma ist als Ausdruck der starken amöboiden Bewegungsfähigkeit ausgebreitet und besitzt lang ausgezogene Ausläufer, die bei enger Lagerung von Zellen ziemlich dicht aneinandergefügt sein können. Wenn auch diese Zellbilder auf Grund der Fixierungs- und Färbevorgänge nur ein momentanes Bild der lebenden Zellen darstellen, lassen sie dennoch sehr gut erkennen, daß bei diesen mononukleären Phagozyten entsprechenden Zellformen sich die kinetische Aktivität auf dem Höhepunkt befindet.
   Das Zytoplasma ist blaß basophil und weist an Zahl und Größe verschiedene Vakuolen oder insgesamt ein etwas schaumiges Aussehen auf. Der Kern ist vielgestaltig, teilweise mehrfach, locker und verhältnismäßig chromatinarm bei deutlich gezeichneter Kernmembran. Im Kern treten 1 bis 2 Nukleolen deutlich hervor (Abb. 6 d),
5. degenerative Zellformen mit großer gestaltlicher und färberischer Variabilität: abnorme Pseudopodienbildung, Zytoplasma und Kerne teilweise homogenisiert, stärker eosinophil und mit Zeichen der Lyse. Kerne z.T. kleeblattartig geformt und gelappt (Rieder-Zelle), z.T. in Bruchstücken zerfallen. Außerdem häufiger honigwabenartige Vakuolen mit hyalinem Inhalt (Abb. 6 e). Mit der Bildung abnormer cytoplasmatischer Fortsätze als Ausdruck des Verlustes der Fähigkeit, aktive Bewegungsvorgänge aufrechtzuerhalten, nimmt die Zahl der Zellen in der Deckglaskultur drastisch ab. Das bedeutet, daß die Zellen im Zuge der Regression die Fähigkeit der Haftung auf der Glasfläche verlieren.

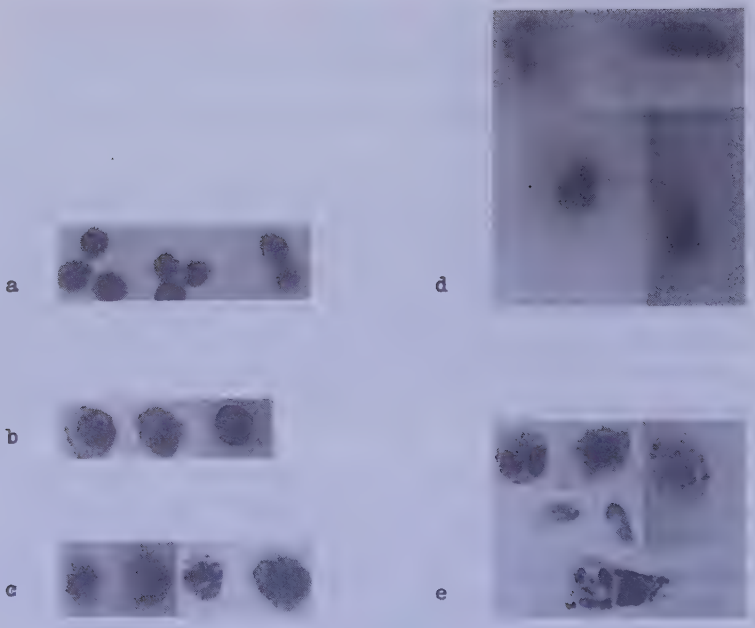


Abbildung 6 In der Deckglaskultur auftretende Zellformen
a kleine und größere lymphoide Zellen
b lymphomonocytoide Zellelemente
c monocytoide Zellen
d reife und aktivierte Zellen
e degenerative Zellformen
Vergr. 5oo-fach, HE

In unserem Versuch sind alle Zelltypen phagzytoseaktiv. Mikroskopisch allein lassen sich allerdings Teilchen, die in der ersten Phase der Phagozytose an der Membran haften, nicht sicher von bereits invaginierten bzw. aufgenommenen unterscheiden.

Es ist jedoch durch das mehrfache Spülen der Zellkulturen weitgehend gewährleistet, daß nur die Zellen als phagozytoseaktiv angesprochen werden, die mindestens aktiv Teilchen an der Zellmembran fixiert haben, und nicht solche mit lediglich passiver Anlagerung von Partikeln. Im Laufe des Versuches treten zahlreiche Zellen der verschiedenen Differenzierungstypen auf, deren Zytoplasma mit Tuschepartikeln zum Teil wie vollgestopft erscheint, ohne daß Zeichen der Degeneration oder gar des Zelltodes feststellbar wären.

Bei den degenerativen Zellformen entsteht der Eindruck, daß die Mehrzahl der zur Phagozytose angebotenen Partikel an der Außenfläche der Membran fixiert ist, wie wenn dieser in einem solchen Zustand eine gewisse klebrige Eigenschaft zukommen würde. Es liegt also eine erste Phase der Phagozytose vor. Nur ganz vereinzelt sind Partikel eindeutig im Zellinnern lokalisierbar. Zum größten Teil scheinen die Zellen zur intrazellulären Einverleibung nicht mehr befähigt. Möglicherweise wird zu einem geringen Teil zwar noch Material in das Zytoplasma aufgenommen, aber parallel zu den fortschreitenden Regressionen aus dem intrazellulären Phagosomensystem wieder in den Extrazellulärraum abgegeben.

Bei den Phagozytoseversuchen in den Deckglaskulturen mit der tweenfreien Kontrollösung und den Tween 8o-haltigen Inkubationslösungen 1 bis 5 fällt quantitativ ein bestimmtes Hervortreten der definierten Zellen vom Typ mononukleärer Phagozyten auf (Tabelle 3).

Inkubationslösung	Inkubationsdauer (min.)	lymphoide	lymphomonocytoide	monocytoide	reife	Haftfähigkeit
		Z E L L T Y P E N				
Kontrolle	1o	+++	++++	(+)	(+)	+
	2o	++	++	++	++	+
	12o	++	++	(+)	++++	
Lösung 1	1o	++++	++	++	(+)	+
	2o	(+)	++	++++	(+)	(+)
	12o					-
Lösung 2	1o	++	++++	(+)	(+)	+
	2o	+++	++	(+)	++	+
	12o	++++	+++	(+)	(+)	(+)
Lösung 3	1o	++	++++	++	(+)	+
	2o	++	++	++	++	+
	12o	+	+	+	++++	+
Lösung 4	1o	++	++	++	++	+
	2o	(+)	+	++++	++	+
	12o	++	+	+	++++	+
Lösung 5	1o	++	++	++	++	+
	2o	++	++	++	++	+
	12o	++	+	+	++++	+

Tabelle 3 Quantitative Verteilung der in den Deckglaskulturen auftretenden Zellformen. (+) ganz vereinzelt, + spärlich, ++ mäßig zahlreich, +++ zahlreich, ++++ überwiegend (sehr zahlreich)

Die quantitativen Aussagen, die in Tabelle 3 niedergelegt sind, wurden durch einfache Abschätzung gewonnen und sind daher approximativ, da durch eine ziemlich unterschiedliche Verteilung der Zellen und Zelltypen in einer einzelnen Deckglaskultur die Auszählung der mononukleären Zellen untereinander beeinträchtigt wird. Als wesentliches Resultat ergibt sich:

a) Die Kontrollen sowie die Inkubationslösungen 3 bis 5 zeigen mehr oder weniger einen gleichartigen Kulturverlauf. Nach 2o Minuten Inkubation zuzüglich der halbstündigen Voranzüchtung treten diese Kulturen nach der Phase der Adhärenz in das Stadium der Ausbreitung und Phagozytose mit dem Sichtbarwerden einer mäßigen Anzahl von monocytoiden und reifen Zellen. Damit entsprechen sie dem von BENNETT gegebenen Rahmen (s.S.11). Die Zellen der Kulturen zeigen zu diesem Zeitpunkt eine beträchtliche Pleomorphie mit einer Reihe von Entwicklungs- bzw. Differenzierungsstadien in annähernd gleicher Verteilung. Nach 12o Minuten Inkubation befinden sich diese Kulturen vollständig in der Ausbreitungsphase mit überwiegend reifen bzw. aktivierten Makrophagen.

b) Die Zellkulturen mit den Lösungen 1 und 2 weichen davon ab. Während nach 1o Minuten Inkubation noch keine Besonderheiten festzustellen sind, scheint bei Lösung 1 bis 2o Minuten die Entwicklung reiferer Zellen mit entsprechender Abnahme der unreifen lymphoiden Formen beschleunigt zu erfolgen bei gleichzeitigem Funktions- d.h. Haftungsverlust. Bei Lösung 2 ist nach 12o Minuten Inkubation eine Rückwärtsentwicklung mit einem verhältnismäßig größeren Anteil der unreiferen Formen feststellbar. Die für eine Ausbreitungs- und Phagozytosephase sprechenden Bilder liegen nicht mehr vor.

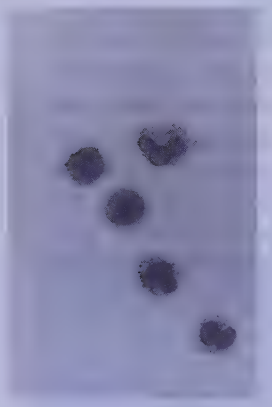
Die einzelnen Phasen und Differenzierungstypen, die quantitativ in Tabelle 3 wiedergegeben sind, sind nach der Kultur für die tweenfreien Kontrollen sowie für die Versuche mit Lösung 2, 3 und 4 festgehalten (Abb. 7 - 18).

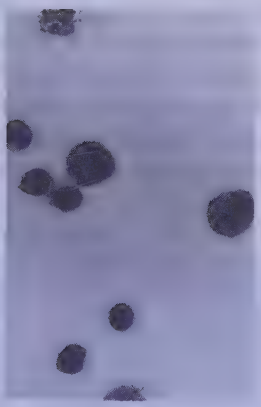
Die Phase der Adhärenz (Abb. 7, 1o, 13,16) bildet den Ausgangspunkt der Versuchsreihen und bietet nach jeweils 1o Minuten Inkubation ein gleichartiges Bild in allen Lösungen. Vorwiegend sind kleine lymphoide Zellen (Abb. 1o, rechter oberer Bildteil), mittelgroße lymphoide Elemente (Abb. 1o, 16, jeweils untere Bildhälfte) und größere lymphoide Zellen (Abb. 7, links

untere Bildhälfte) sichtbar. Monocytoide Zellen sind selten (Abb. 13, rechte Seite: monocytoide Zelle mit isolierter großer Vakuole im Zytoplasma und abgeplattetem randständigem Kern). Die Phagozytose ist zu diesem Zeitpunkt gering und tritt auf den Abbildungen nicht in Erscheinung.

Zu Beginn der Ausbreitungs- und Phagozytosephase nach 2o Minuten Inkubation (Abb. 8, 11, 14, 17) werden die Zellen größer und nehmen in einem gewissen Umfang die Gestalt reifer Makrophagen an (Abb. 14 rechts oben, Abb. 17 links unten reife Phagozyten in langgestreckter, teils rundlicher Form). Außerdem treten monocytoide Zellen mit Phagozytose auf (Abb. 8, oberer und unterer Bildrand), spindelig ausgezogene lymphomonocytoide mononukleäre Zellen (Abb. 14, linker unterer Bildteil). Ein abweichendes Verhalten zeigen die Zellen bei Lösung 2. Sie weisen Schädigungsmerkmale und Absterbeerscheinungen auf (Abb. 11: Zellen vom lymphomonocytoiden Typ, am linken Bildrand monocytoide Zelle, am unteren Bildrand größere lymphoide Zelle). Das Zytoplasma erscheint unregelmäßig begrenzt und stellenweise wie ausgefranst. Vereinzelt haften an der Zellwand Fremdteilchen (Abb. 11, Zellen am linken und rechten mittleren Bildrand).

Während der Ausbreitungs- und Phagozytosephase nach 12o Minuten Inkubation (Abb. 9, 12, 15, 18) erscheinen sehr zahlreich reife Makrophagen (Abb. 15 rechts oben, Abb. 18, unteres Bilddrittel). Sie zeigen einen auffallend breiten, zart granulierten oder schaumig-wabigen Zytoplasmasaum und einen infolge der unregelmäßigen Chromatindichte gesprenkelt erscheinenden Zellkern. Daneben monocytoide Zellen mit rundlichem Kern und grobblasigen Vakuolen im Zytoplasma (Abb. 15, unterer Bildrand). Die Phagozyten sind teilweise stark mit Tusche beladen. Vereinzelt finden sich hyaline Einschüsse in zytoplasmatischen Vakuolen als Hinweis für eine gewisse katabiotische Tendenz (Abb. 9, 2. Zelle von oben).





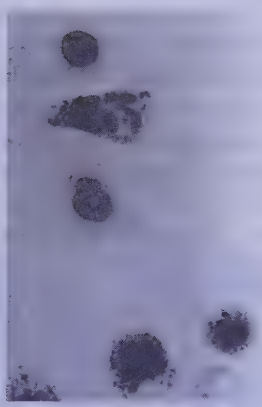
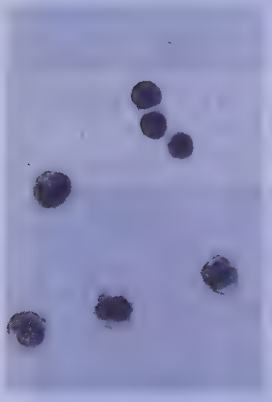
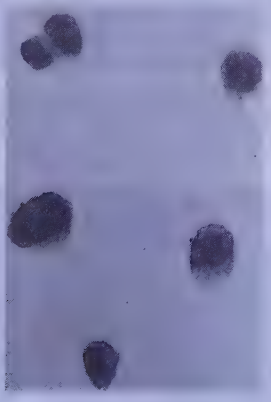


Abb. 7: 1o Minuten Abb. 8: 2o Minuten Abb. 9: 12o Minuten
Inkubation in Tween 8o-freier Kontrollösung





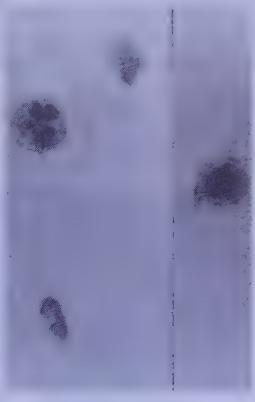
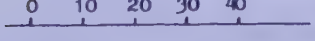


Abb. 1o: 1o Minuten Abb. 11: 2o Minuten Abb. 12: 12o Minuten
Inkubation in Lösung 2 (o,5 x $1o^{-1}$ % Tween 8o)

Vergrößerung 5oo-fach HE.

Maßstab



Die Zellkultur bei Lösung 2 läßt eine regelrechte Ausbreitungs- und Phagozytosephase vermissen (Abb. 12). Die überwiegend lymphoiden Formen sind schwer degenerativ geschädigt oder bereits nekrotisch: Ausgefranste unregelmäßige Zytoplasmabegrenzung (Abb. 12, linker Bildrand), vielgestaltige Umformung der Kernmasse mit Auftreten lobulierter Kernformen (Abb. 12 rechts unten), autolysierende Zellen (Abb. 12, oben und unten).

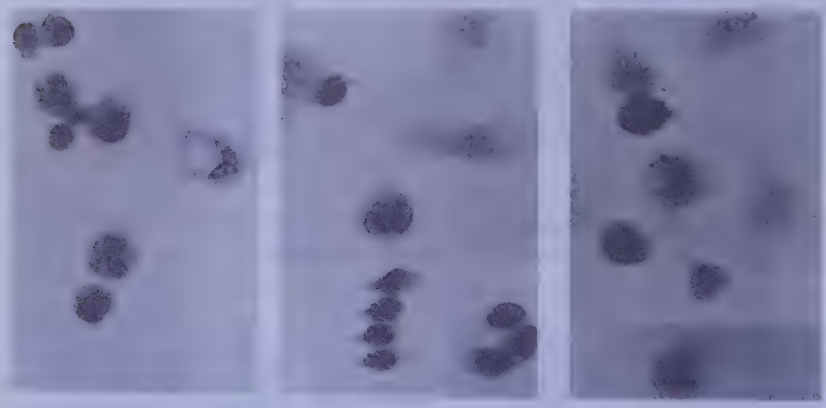


Abb. 13: 1o Minuten Abb. 14: 2o Minuten Abb. 15: 12o Minuten Inkubation bei Lösung 3 (o,5 x $1o^{-2}$ % Tween 8o)

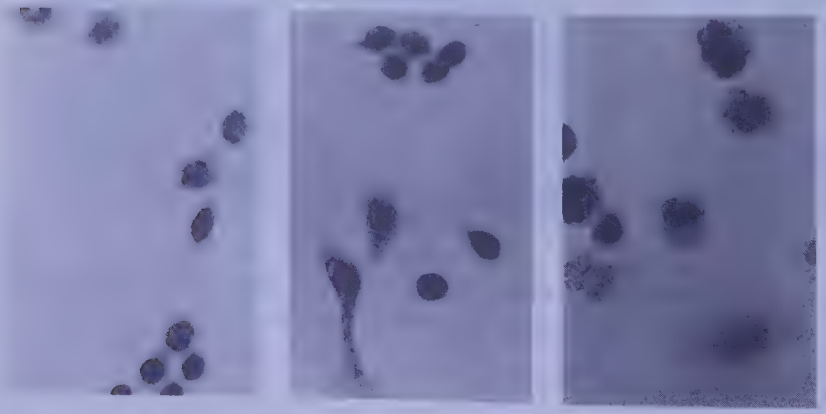


Abb. 16: 1o Minuten Abb. 17: 2o Minuten Abb. 18: 12o Minuten Inkubation bei Lösung 4 (o,5 x $1o^{-3}$ % Tween 8o)
Vergrößerung 5oo-fach, HE

Maßstab: 0 10 20 30 40 micron

3.2.2. Zellbefunde in den Vitalpräparaten

Die Zellen der Deckglaskulturen werden phasenkontrast-mikroskopisch einheitlich nach einer Inkubationsdauer von 2o Minuten untersucht, da die Phagozyten sich zu dieser Zeit auf dem Höhepunkt ihrer funktionellen Aktivität befinden und Unterschiede hinsichtlich der Teilchenaufnahme in den verschiedenen Lösungen am deutlichsten erkennen lassen. Daneben werden auch Kulturen nach kürzerer und längerer Inkubationszeit untersucht.

In den Lösungen 1 und 2 treten nach einer Inkubation von 2o Minuten neben cytoplasmatisch stärker ausgebreiteten, sonst unauffälligen Zellen (Abb. 19 a) vermehrt Elemente auf mit abnormen Befunden am Ektoplasma und an der Membran. Im Ektoplasma erscheinen entweder isolierte sich ausdehnende und bis zur Zellmembran reichende Vakuolen (Abb. 19 c, rechte Bildrandmitte) oder als grobblasige Vakuolenkonglomerate imponierende Formationen (Abb. 19 b).

Diese phasenhellen Vakuolenformationen im Zytoplasma sind von Zellen in einem hypotonen Medium gut bekannt, sie entsprechen einem durch erhöhte Permeation extrazellulärer Flüssigkeit entstandenen Ödem der intrazellulären und perinukleären Membranen und Zellkompartimente und stellen in vielen Fällen ein Stadium auf dem Weg zum Zelltod dar. Hinzu kommen blasige Bildungen der Zellmembran selbst (Abb. 19 d, e). Sie erreichen eine erhebliche Größe und neigen offenbar dazu, die Zelle zu verlassen (sog. Potozytose).

Der Zellkern verändert sich ebenfalls, nimmt wegen eines Ödems an Volumen zu und rundet sich ab. Das Chromatin wird homogen, die Nukleoli bleiben aber scharf abgegrenzt, auch hier treten vakuolenartige Bildungen auf, die im Unterschied zu Zytoplasma- und Membranvakuolen durch eine phasendichte Begrenzung meist scharf konturiert und wie ausgestanzt erscheinen. Hinzu tritt oftmals eine Aufsprengung des Kernes (Abb. 19 d, linke

Bildhälfte). Derart beschaffene Zellen enthalten im Zytoplasma nur verhältnismäßig wenig Einschlüsse von phasendichten Kohlepartikeln.

Nach mehr als 2o-minütiger Inkubation in den Lösungen 1 und 2 zeigen die Zellen vermehrt schwerere regressive Stadien (Abb. 2o a, b). Nunmehr werden Zellen mit ungewöhnlich geformten zytoplasmatischen Pseudopodien offenbar als Ausdruck eines Beweglichkeitsverlustes infolge der zytoplasmatischen Konsistenzänderung oder einer Alteration der Pseudopodienbewegungen sichtbar (Abb. 21). Es treten auch abgestorbene autolysierende Zellen mit Verflüssigung der Zytoplasmastrukturen und Kernpyknose auf (Abb. 2o c).

Eine gewisse Typisierung der Zellen in der Deckglaskultur ist nach den oben (S. 38) aufgestellten Kriterien auch phasenmikroskopisch möglich (Abb. 22 a, b). Die lymphoiden Zellen sind wegen ihrer stärkeren Abrundung nicht scharf darstellbar. Bei den reiferen Zellformen sind die feinen Kräuselungen der undulierenden Zellmembran und die schleierartigen Zytoplasmaausläufer als Charakteristikum des phagozytierenden mononukleären Zellsystems immer sichtbar und heben sich deutlich von analogen Bildungen der Zellperipherie bei Granulozyten ab, die diese nur unvollkommen und nur unter bestimmten Bedingungen entwickeln können.

Die Kulturen in der Lösung 3 mit der erwiesenen gesteigerten Phagozytoseaktivität enthalten reife Peritonealmakrophagen mit regulärer Struktur (Abb. 22 a, b), die mit den Zellen der Inkubationslösung 4 und 5 sowie der Kontrollösung nach Struktur und Häufigkeit vergleichbar sind (Abb. 23).

Nach längerer als 2o-minütiger Inkubation treten in den Lösungen 3 bis 5 sowie in der Kontrollösung aktivierte Makrophagen mit einem vergrößerten Zytoplasma auf, das zahlreiche fingerartige Fortsätze als Ausdruck der gesteigerten Motilität aufweist. Daneben sind filamentöse Zytoplasmastrukturen sichtbar,

die ebenfalls in Zusammenhang mit der vermehrten Beweglichkeit stehen und aus der Retraktion von Zytoplasmavorwölbungen hervorgehen. Diese im Phasenkontrastmikroskop sich darstellenden aktivierten Zellen besitzen meist eine vermehrte Granulierung, die Menge der aufgenommenen Partikel ist oft erhöht. Diese Zellformen entsprechen als solche wohl noch nicht Typen von Degenerationen, zumal Zytoplasma und Kern selbst ein unauffälliges Bild bieten (Abb. 24 a, b). Allerdings können vereinzelt Zellen erscheinen, die stärker alteriert sind und von regressiven Formen trotz erhaltener Haftfähigkeit nicht mehr sicher abgrenzbar sind (Abb. 24 c).

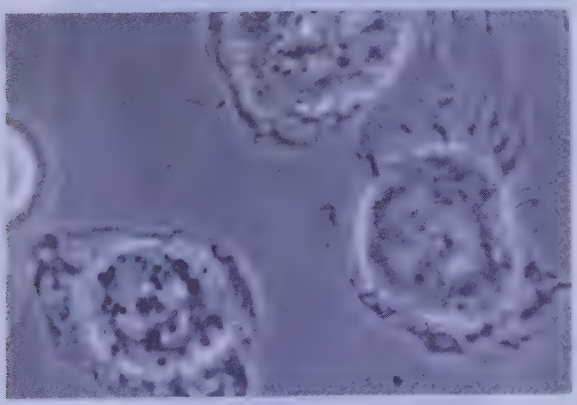


Abbildung 19 a - e

Makrophagen nach 2o Minuten Phagozytose in Lösung 1

Vergr. 1ooo-fach, Phasenkontrast

Abb. 19 a Makrophagen mit und ohne Phagozytose, keine pathologischen Veränderungen. Zelle rechts mit einem breit auf der Unterlage haftenden, etwas erstarrt erscheinenden Zytoplasmafortsatz, übrige Zelle in Bewegung mit gefältelter Zytoplasmamembran, an deren äußerem Ende feine Kräuselungen als sekundäre Faltenbildungen auftreten. Übrige Makrophagen mit teilweise deutlichen, den Eindruck des Undulierens vermittelnden Membrankräuselungen, mit phasenhellen Vesikeln, gesprenkelten Kernen und phasendichten Tuschepartikeln perinukleär.

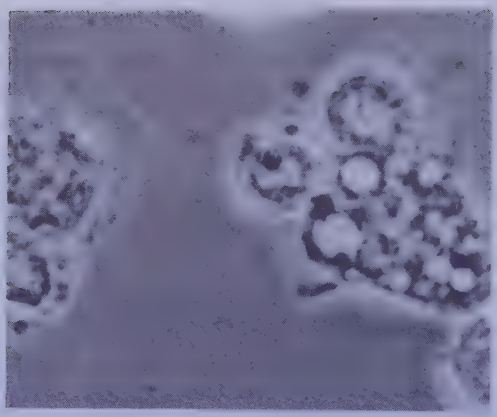


Abb. 19 b Makrophage mit vergrößerten Vakuolen im Zytoplasma (rechts)

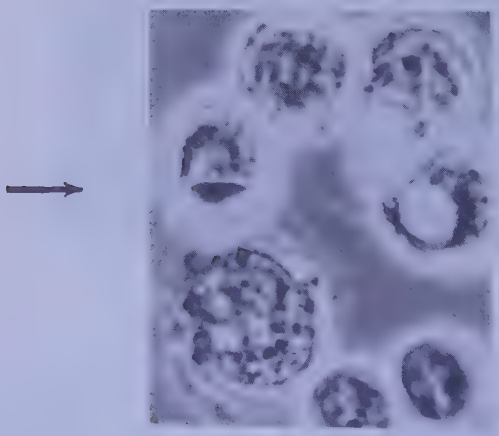


Abb. 19 c Makrophage mit großem bis in die Nähe der Zellmembran reichendem vakuolenartigem Bezirk (rechte Bildrandmitte) und möglicherweise beginnender Pyknose (Pfeil)

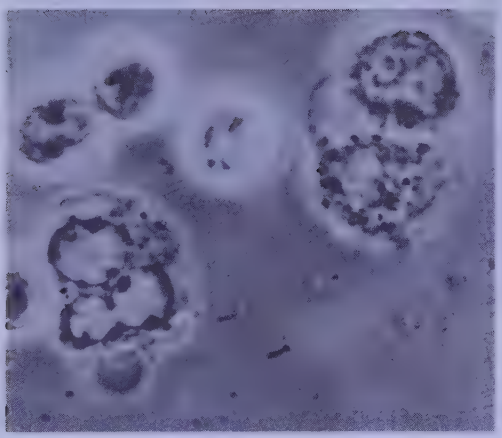


Abb. 19 d Makrophage mit Kernödem (links): drei große runde Vakuolen mit phasendichter scharfer Begrenzung und runden Chromatinformationen am Rande (Nukleoli?) im geschwollenen, vielleicht fragmentierten Kern. Jenseits der Kernvakuolen weitere kleinere Vakuolen, übriges Zytoplasma unauffällig granuliert mit einigen Tuschepartikeln. Rechts Makrophage mit runder blasiger Vakuole intrazellulär und Blasenbildung im Bereich der Membran, die sich wahrscheinlich von der Zelle zu lösen beginnt. Auch hier Zytoplasmagranulation unauffällig.

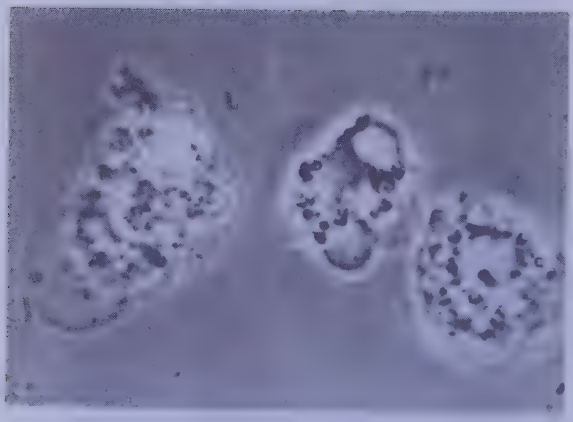


Abb. 19 e Makrophagen mit gleichartigen pathologischen Kern- und Membranveränderungen wie in Abb. 19 d. Zellgrenzen durch größere Vakuolen in der Zytoplasmaperipherie vorgewölbt, übrige Struktur des Zytoplasmas und der nierenförmigen Kerne unauffällig, reichlich phagozytiertes Material.

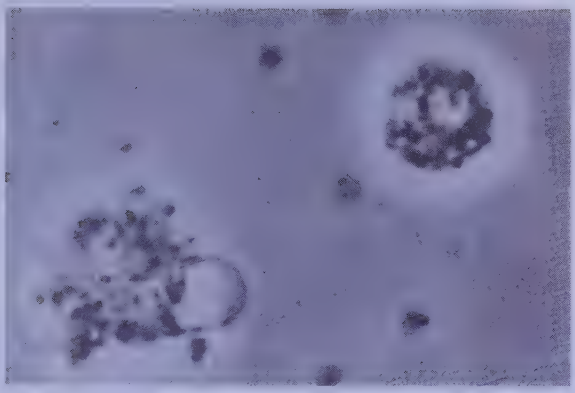


Abbildung 2o a - c

Makrophagen nach 6o Minuten Phagozytose in Lösung 1

Vergr. 1ooo-fach, Phasenkontrast

Abb. 2o a Weit fortgeschrittene Blasenbildung an der Oberfläche des Makrophagen.

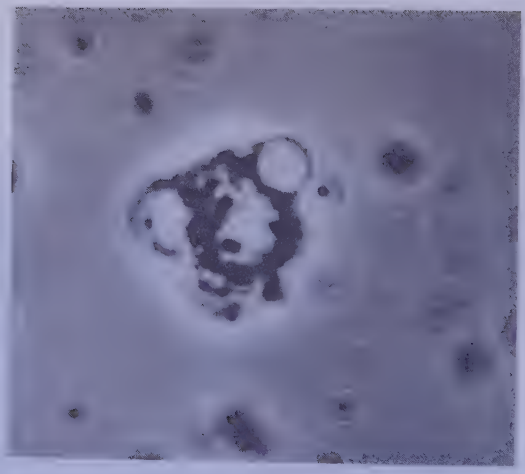


Abb. 2o b Makrophagen mit vakuoliger Membranveränderung und Kernpyknose, im Zentrum des Kernes homogener Inhalt, Chromatin zu einem runden phasendichten Band vereinigt. Im übrigen zahlreiche außerhalb der Photoebene liegende nicht haftende, größtenteils autolysierende Makrophagen.

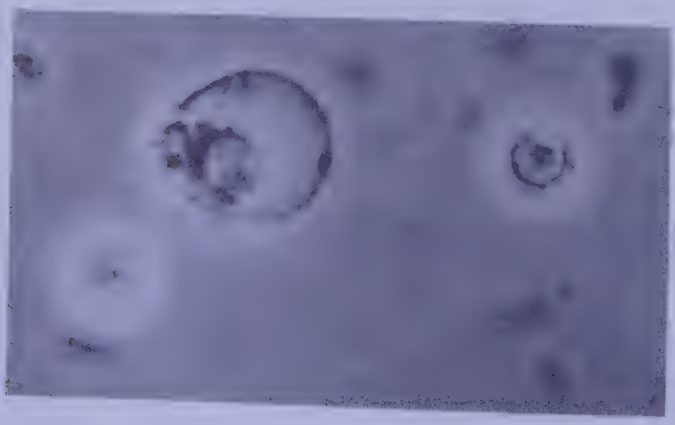


Abb. 2o c Abgestorbener Makrophage mit Ödem und Kernpyknose. Zytoplasma sphärisch und weitgehend homogenisiert. Übrige Makrophagen nicht haftend und nicht sicher beurteilbar.

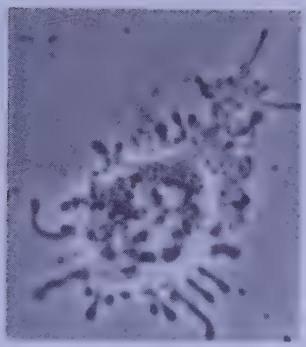


Abbildung 21 Makrophage nach 6o Minuten Inkubation in Lösung 2

Vergr. 1ooo-fach, Phasenkontrast

Makrophagenzytoplasma mit zahlreichen fadenartigen, am Ende kolbig verdickten und phasenintransparenten Ausläufern, die passiv in der Inkubationsflüssigkeit flottieren bei Verlust der Haftfähigkeit und koordinierten Pseudopodienbewegung. Kernchromatin unauffällig.

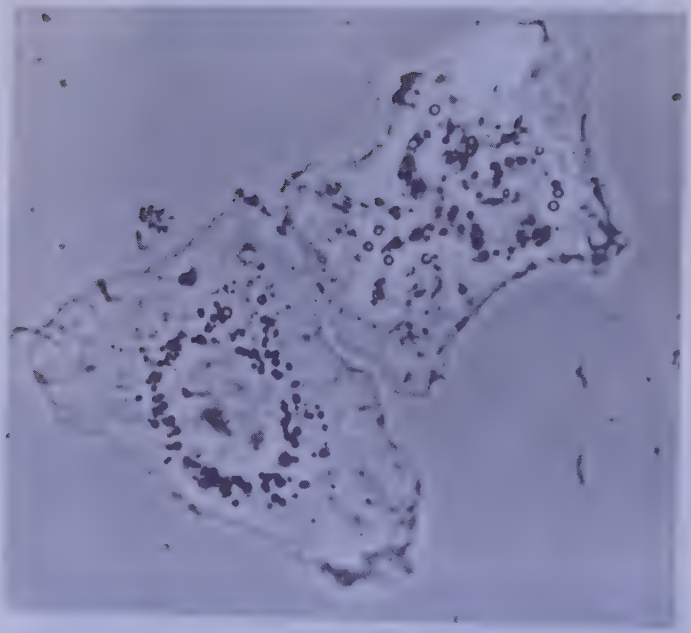


Abbildung 22 a, b

Verschiedene Differenzierungstypen von Makrophagen nach 2o Minuten Inkubation in Lösung 3.
Vergr. 1ooo-fach, Phasenkontrast

Abb. 22 a Aktivierte Makrophagen mit deutlicher Größenzunahme und ausgebreitetem Zytoplasma: flache Pseudopodien mit fein gekräuselten Membranspitzen. Ovaler fast zentral gelegener Kern mit aufgelockerter Struktur. Im perinukleären Zytoplasma ein dichter Kranz von scharf gezeichneten phasendichten Tuschepartikeln. Vereinzelt phasendurchsichtige Vesikel. Zellen zum Teil aneinanderliegend und an anderen Stellen überlappend ohne Zeichen einer Fusion.

Maßstab

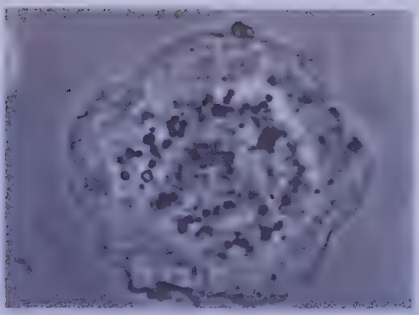


Abb. 22 b Monocytoider Makrophage. Zelle mittelgroß, Oberfläche mit flachen Vorsprüngen und welligen Bezirken. Im Zytoplasma reichlich wechselnd phasendichte Granula, perinukleär phagozytierte Tuscheteilchen. Kerne knapp halb so groß wie die Zelle mit typischem Chromatin.

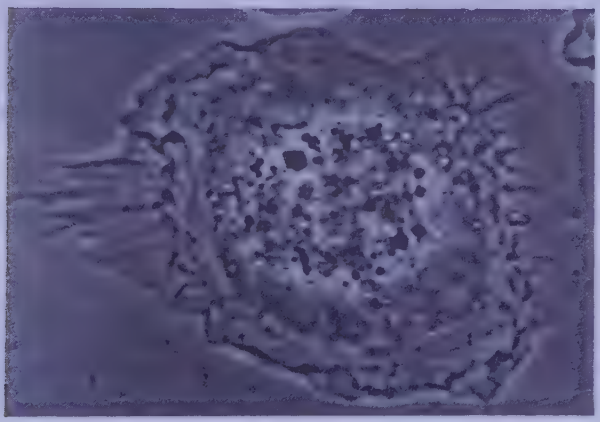


Abb. 23 Reifer Makrophage nach 2o Minuter Inkubation in Lösung 4. Vergr. 1ooo-fach, Phasenkontrast

An der Oberfläche der vergrößerten Zelle ausgedehnte undulierende Membranabschnitte mit fächerartigen (links) und grobgelappten (rechts) Ausläufern. Perinukleäres Zytoplasma dicht mit phasenhellen Vesikeln und phasendichten Granula sowie reichlich phasenundurchsichtigen Tuscheteilchen ausgefüllt. Kern unauffällig.

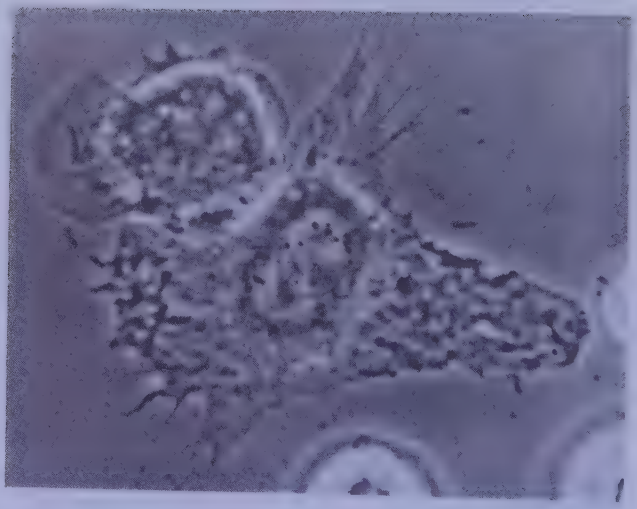


Abbildung 24 a-c

Aktivierte Makrophagen nach längerer Inkubation in Lösung 3 und 4 sowie in der Tween 8o-freien Kontrollösung.

Vergr. 1ooo-fach, Phasenkontrast

Abb. 24 a Makrophagen nach 6o Minuten Inkubation in Lösung 3. Zahlreiche langgestreckte, fädig und verzweigt endigende Zytoplasmaausläufer, Zytoplasma der linken Hälfte filamentartig verdichtet. Perinukleär einige mittelgroße Vesikel und mäßig viel aufgenommene Tusche. Kern regelhaft.

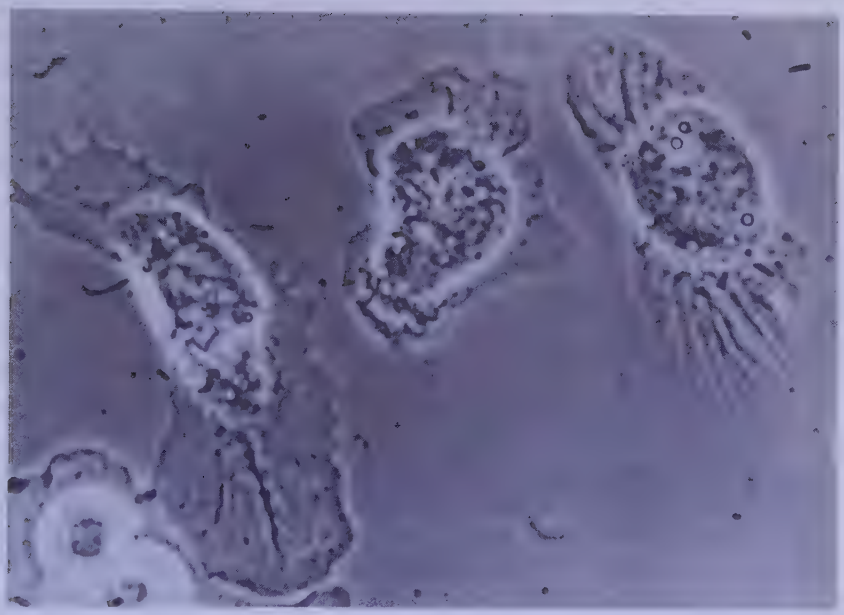


Abb. 24 b Makrophagen nach 12o Minuten inkubation in Lösung 4. Stärkere Größenzunahme der Zellen parallel zur Glasoberfläche. Zytoplasma filamentös verdichtet, dünne Zytoplasmafortsätze und kleine wellige Membranabschnitte in Motion. Linke Zelle gestreckt mit exzentrisch gelagertem unauffälligem Kern. Aufgenommene Tusche teilweise in einer tieferen Ebene perinu kleär angeordnet und sich ringförmig scharf konturiert abbildend.

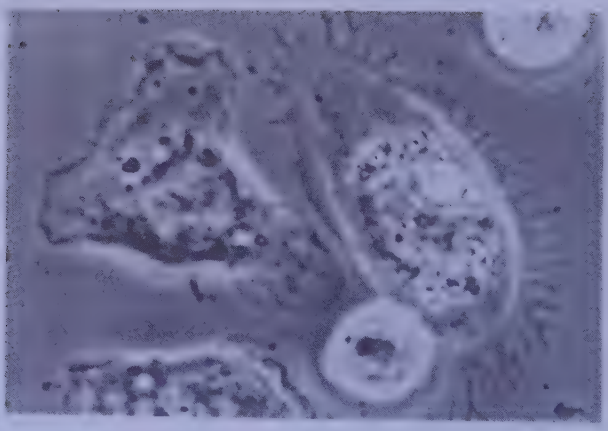


Abb. 24 c Makrophagen nach 12o Minuten Inkubation in Tween-freier Kontrollösung

Zelle rechts mit ausgedehnter, wahrscheinlich regressiv entstandener Verästelung der Zellperipherie, mit verhältnismäßig großen perinukleären Vakuolen und unscharf gezeichnetem alteriertem Kern. Keine sicheren Tuscheteilchen im Zytoplasma. Zelle links unauffällig.

4. Diskussion

In dem dieser Studie zugrunde liegenden Experiment sollte mit einem verhältnismäßig einfachen Versuchsansatz die Wirkung der oberflächenaktiven synthetischen Substanz Tween 8o auf Funktion und Morphologie der Peritonealmakrophagen der Maus in vitro untersucht werden.

Für die Funktion wurde die Phagozytoserate des genannten Zellsystems prozentual bestimmt und als Ausdruck der Phagozytoseaktivität gewertet. Diese stellt eine mit einfachen Mitteln meßbare Größe der charakteristischen Funktion der Zellen dar, zu deren System auch die Peritonealmakrophagen gehören. Parallel zum quantitativen Effekt sollte das morphologische Verhalten des getesteten Zellsystems licht- und phasenkontrastmikroskopisch verfolgt werden.

Da MICHELL et al. (1969) die Notwendigkeit betonen, durch eine geeignete Versuchsanordnung die Phagozytoserate der Anfangsphase, während der eine annähernd lineare Aktivitätszunahme erfolgt und quantitative Unterschiede der Teilchenaufnahme am stärksten ins Gewicht fallen, von der eventuellen Phagozytosekapazität einer Zellkultur während längerer Inkubationsdauer zu unterscheiden, wurde zur Bestimmung der Phagozytoseaktivität die Methode einschichtiger Deckglaskulturen gewählt. Sie ermöglicht verhältnismäßig kurze Inkubationszeiten für die Phagozytose und eine mikroskopische Untersuchung der Phagozyten.

Auf diese Weise konnten Verlauf der Phagozytose und deren Modifikationen durch die Einwirkung von Tween 8o verfolgt werden. Es zeigt sich in der vorliegenden Untersuchung, daß bei einer Expositionszeit für die Phagozytose von 2o Minuten die Phagozytoserate unter der Einwirkung von Tween 8o in geeigneter Konzentration signifikant zunimmt. Diese Rate liegt unter der gegebenen Voraussetzung im Bereich der Anfangsphase, d.h.

wenn sich die Phagozytoseaktivität des Versuchssystems kontinuierlich steigert, während bei wesentlich kürzerer Expositionszeit (1o Minuten) die Phagozytose noch nicht richtig angelaufen ist. Dagegen ist die Phagozytose nach einer deutlich längeren Exposition von 12o Minuten unter den gegebenen Versuchsbedingungen bereits so weit fortgeschritten, daß in keinem Falle die Phagozytoserate durch Tween 8o weiter gesteigert werden kann. Bei höheren Tween 8o-Konzentrationen ist nach 2o Minuten die Zahl der phagozytierenden Zellen vermindert, nach längerer Exposition die Zahl der Zellen insgesamt reduziert.

Die gleichzeitige mikroskopische Kontrolle der Zellkultur läßt eine Differenzierung der kultivierten Zellen mit dem Auftreten reifer Zelltypen erkennen, die Reizformen der Makrophagen ähnlich sind, und außerdem einzelne Zellen mit Schädigungsmerkmalen. Regressiv veränderte Makrophagen sind eindeutig vermehrt nach Einsatz der höher konzentrierten Tween 8o-Lösungen, etwa parallel dazu sinkt die Phagozytoserate ab. Im Falle der durch Tween 8o gesteigerten Phagozytoserate ergibt sich jedoch kein auffälliger zellulärer Strukturbefund.

4.1. Beeinflussung der Phagozytoserate

In unseren Versuchen wurden gleichzeitig Kohlepartikel wie Phagozyten während der Kultur der Einwirkung des oberflächenaktiven Tween 8o ausgesetzt. Nach der bisher geltenden Hypothese von FENN (1922) sowie nach den Untersuchungen und Schlußfolgerungen von BERRY et al. (1949) sollte sich dabei die Phagozytose nicht wesentlich ändern.

Die Untersuchungen von ASIDDAO et al. (1964) über die Phagozytose von Tusche in der Rattenleber nach Perfusion des Organs in situ haben jedoch bereits bemerkenswerte Änderungen der Tusche-Clearance als Effekt verschiedener Konzentrationen von

Tween 8o und anderen oberflächenaktiven Substanzen ergeben. Unter Berücksichtigung der FENN'schen Hypothese wurde daher gefolgert, daß diesem Phänomen ein Mechanismus zugrunde liegen müsse, der im Falle der Abnahme der Clearance die Netzwirkung auf die Partikel, im Falle der Zunahme derselben auf die Kupffer'schen Sternzellen der Leber dominieren lasse.

Inzwischen sind verschiedene physiko-chemische Theorien entwickelt worden, um die Anziehungs- und Abstoßungskräfte zwischen den Grenzflächen verschiedener Stoffe und Phasen näher zu charakterisieren und zu erklären (AMBROSE, 1964). Aus ihnen ergibt sich, daß die Benetzbarkeit der bei der Phagozytose beteiligten Oberflächen zwar eine Rolle spielt, daß es aber nicht möglich ist, eine direkte einfache Beziehung zwischen dieser Eigenschaft und der Partikelaufnahme durch die Zelle herzustellen.

Während die Natur der abstoßenden Kräfte einigermaßen klar zu sein scheint und zwar in dem Sinne, daß diese im wesentlichen von der Dichte der elektrischen Ladung an der Oberfläche der jeweiligen sich in einem bestimmten Aggregatzustand befindenden Stoffe und in zweiter Linie von van der Waals-schen abstoßenden Kräften sowie sterischen Barrieren (PETHICA, 1961) abhängen, ist die Zahl der anziehenden Kräfte wahrscheinlich größer. Zu ihnen gehören zunächst chemische kovalente Bindungskräfte und Bindungskräfte durch Wasserstoff- und Kalziumbrükkenbildungen, anziehend wirksame van der Waals-sche Kräfte, weiterhin Bindungen zwischen Ionenpaaren und -triplets sowie Kräfte, die durch Ladungsströme und -mosaike gleichen und entgegengesetzten Vorzeichens auf Oberflächen entstehen. Ferner sind Oberflächenenergie und andere bisher bekannte zwischenmolekulare Kräfte zu nennen wie zum Beispiel Debye-Effekte, die durch Induktionswirkung zwischen permanenten Dipolen und zwischen Dipolen und benachbarten Molekülen auftreten.

Über die relative Bedeutung dieser bisher bekannten verschiedenen Anziehungskräfte und ihre Beziehungen untereinander läßt

sich noch nichts Sicheres aussagen (AMBROSE, 1964). Einleuchtend ist, daß ihre Summe größer sein muß als die Summe der abstoßenden Kräfte zwischen Partikel und Zelle, wenn eine Phagozytose überhaupt statthaben soll. Überträgt man die Beobachtungen, die PETHICA (1961) und BANGHAM (1964) über die Adhäsion von Zellen gemacht haben, auf die Fixierung von Material an der Makrophagenaußenfläche, kann diese nur gelingen, wenn der Makrophage in der Lage ist, zahlreiche Mikrovilli an der Oberfläche auszubilden. Ihre Spitzen dürfen dabei den kritischen Durchmesser von o,1 micron nicht erreichen, wodurch theoretisch die Oberflächenladung so weit reduziert wird, daß das Teilchen mit Hilfe gewöhnlicher thermischer Energien sich der Zelle entgegen den weitreichenden elektrostatischen Abstoßungskräften genügend nähern kann, um in den Bereich der nur auf kürzere Distanz wirksamen anziehenden Kalziumbrückenbindungskräfte zu gelangen.

Für die physikalische, die Oberflächenenergie herabsetzende Wirkung der Detergentien gilt, daß diese nur einen Faktor der physikalisch-chemischen Gegebenheiten bei der Phagozytose modifizieren, der wahrscheinlich nicht der wichtigste ist. Wirkungen auf andere Faktoren sind zwar sicher, aber schwer abzuschätzen (DURHAM, 1957). Dazu gehört, daß Detergentien, wenn nicht Calcium-Brückenbindungen, so doch Wasserstoffbrückenbindungen an der Zelloberfläche begünstigen könnten, die die elektrostatische Abstoßung verringern oder die Bildung eines Ladungsmosaikes von positiven und negativen Ladungen fördern (AMBROSE, 1964). Weiterhin ist denkbar, daß Detergentien indirekt die Abstoßungskräfte verringern, indem sie den Zellstoffwechsel stimulieren und die Zellen deshalb die erforderliche Energie aufbringen, durch Änderung der Proteinstruktur an der Zelloberfläche die Ladungen auseinanderzuziehen (AMBROSE, 1964).

In quantitativer Hinsicht bestätigt unsere Untersuchung über die Phagozytose unter den Bedingungen der Kultur die Beeinflußbarkeit der Partikelaufnahme durch oberflächenaktive Verbindungen, die ASIDDAO et al. (1964) bereits durch Clearance-

Verfahren an der perfundierten Rattenleber gefunden hatten, wobei sie jedoch das Risiko bei allen Clearance-Methoden eingehen mußten, daß die Resultate durch nicht näher faßbare Faktoren wie Organdurchblutung, Adsorption von Fremdteilchen an Gefäßwänden und Bindung an Thrombozyten verfälscht werden (ROWLEY, 1962).

Im einzelnen zeigt sich, daß Tween 8o auf die Phagozytose von Makrophagenpopulationen aus der Peritonealhöhle der Maus einen Effekt in der Weise auszuüben vermag, daß die Phagozytoserate bei einer Konzentration von o,5 x $1o^{-2}$ (Lösung 3) während einer Inkubations- und Expositionsdauer zwischen 2o und 6o Minuten gegenüber derjenigen ohne Tween 8o und sonst gleichen Bedingungen gesteigert wird.

Demgegenüber ist es nicht möglich, durch Tween 8o die Phagozytoserate nach längeren Inkubationszeiten (12o Minuten) zu erhöhen. Dies kann man in der Weise zu interpretieren versuchen, daß es in jedem phagozytierenden Zellsystem einen Anteil von Zellen gibt, die unter der aktuellen Bedingungskonstellation nicht phagozytieren (MASSHOFF und OEHLER, 1965). Das würde nichts anderes heißen, als daß dieser Anteil durch Tween 8o überhaupt nicht tangiert wird, sondern lediglich die Zellen, die innerhalb einer bestimmten Zeitspanne irgendwann zur Phagozytose aktiviert werden, und zwar unter Einwirkung von Tween 8o beschleunigt in einer früheren Expositionsphase (Abb. 1). Die beschleunigte Aktivität phagozytierender Zellen bei unveränderter Gesamtleistung kommt einer verstärkten Reaktion eines entsprechenden Zellsystems auf phagozytierbare Teilchen gleich, was biologisch von nicht geringer Bedeutung ist. Wenn die Veränderlichkeit der Initialrate bei der Phagozytose nicht genügend beachtet wird, kann dieser Gesichtspunkt in keiner Weise erfaßt werden, und es können widersprüchliche Ergebnisse resultieren (MICHELL et al., 1969).

Der die Phagozytose aktivierende Effekt von Tween 8o ist bei geeigneter Konzentration erst nachweisbar, wenn das zu phagozytierende Material und die oberflächenaktive Substanz eine Mindestzeit auf die Zellen eingewirkt haben. Bei unserer Ver-

suchsanordnung beträgt diese Zeit 2o Minuten. Eine Inkubationszeit von 1o Minuten bleibt quantitativ ohne Auswirkungen. Bei Einsatz von Tween 8o in niedrigeren Konzentrationen (Lösung 4 und 5) entspricht die Phagozytoserate jener in der Tween-freien Kontrollösung.

Inkubationslösungen, deren Gehalt an Tween 8o die phagozytosesteigernde Konzentration überschreitet (Lösung 1 und 2), lassen die initiale Phagozytoserate (nach 2o Minuten) deutlich abnehmen. Nach einer Inkubation von 12o Minuten ist das Niveau der Phagozytoserate nicht mehr zu bestimmen, weil die Haftfähigkeit der Zellen größtenteils aufgehoben ist. Bei der kürzeren Inkubationszeit von 1o Minuten verhalten sich die höher konzentrierten Lösungen 1 und 2 wie die übrigen Tusche-Tween 8o-Lösungen, gegenüber der Kontrollösung läßt sich kein Unterschied erkennen.

Zusammengefaßt läßt sich als Ergebnis des quantitativen Teils feststellen, daß nur in einem verhältnismäßig engen Konzentrationsbereich von Tween 8o und nur während einer verhältnismäßig begrenzten Zeitspanne eine Steigerung der Phagozytoserate nachweisbar ist, daß dagegen die Phagozytoserate nach längerer Inkubationsdauer mit der oberflächenaktiven Substanz nicht weiter erhöht wird.

Sobald die Konzentration um eine Zehnerpotenz abnimmt, ist ein phagozytosesteigernder Effekt zu den angesetzten Untersuchungszeiten nicht mehr nachweisbar. Wenn dagegen gegenüber der phagozytosesteigernden Konzentration der Anteil des oberflächenaktiven Tween 8o um den Faktor 1o ansteigt, ist als Ergebnis nach einer gewissen Zeit eine bedeutende Abnahme der Phagozytoserate zu registrieren. Die verschiedenen Konzentrationsbereiche, in denen Tween 8o die jeweils entgegengesetzten Effekte zeigt, liegen eng beieinander und unterscheiden sich in unserem Experiment jedesmal um den Faktor 1o. Bei den Versuchen von ASIDDAO et al. (1964) bewegte sich der Konzen-

trationsunterschied von Tween 8o bei der Perfusionslösung mit phagozytosesteigernder und phagozytosehemmender Wirkung zwischen $5 \times 1o^{-4}$ % und $5 \times 1o^{-3}$ %, also ebenfalls um den Faktor 1o. Damit ist die Grenze zwischen der entgegengesetzten stimulierenden und hemmenden Wirkungsmöglichkeit von Tween 8o ziemlich schmal.

Für alle Messungen unserer Untersuchung gilt, daß nur die quantitative Dynamik der ersten beiden Phasen der Phagozytose erfaßbar ist, nämlich die Phase der Bindung bzw. Haftung der Partikel an der Zelloberfläche sowie die Phase der Invagination der Zellmembran bis zum Einschluß der Fremdteilchen. Die folgende Phase der Phagozytose, die gewöhnlich den Transport und die Digestion der Partikel im Zytoplasma sowie die eventuelle Eliminierung bestimmter Restsubstanzen umfaßt, liegt dabei außerhalb der Erfassungsmöglichkeit.

4.2 Zellmorphologie

BENNETT (1966) teilt die Kultur von Peritonealmakrophagen der Maus in vier Phasen ein. Nach Abschluß der etwa 1 Stunde benötigenden Adhärenz folgt das Stadium der Ausbreitung der Zellen auf der Glasoberfläche und gleichzeitig der vollen Aktivitätsentfaltung der Phagozytose. Nach vier Tagen soll die eigentliche Mitosephase mit einer niedrigen Mitoserate, aber quantitativ nachweisbaren Vermehrung der Zellen in der Kultur eintreten, um schließlich am zehnten Tag in die Phase der verlängerten Kultur einzumünden.

In unserem Versuch haften die Zellen bereits nach einer Anzüchtung von 3o Minuten, die zur Gewinnung der einschichtigen Deckglaskulturen stets vorausgeht (s.S. 23), an der Glasunterlage mit einer Kraft, die größer ist als jene des Flüssigkeitsstromes der nachfolgenden mehrfachen Waschung der Kultu-

ren. Nach einer anschließenden Inkubation von 1o Minuten unter Kulturbedingungen, d.h. nach einer Bebrütung von insgesamt 4o Minuten, zeigen die Kulturen in allen Lösungen noch die gleiche zelluläre Zusammensetzung wie die frisch gewonnene Peritonealflüssigkeit (Tabelle 3).

Nach der Inkubation von 2o Minuten Dauer und einer insgesamt 5o-minütigen Kultivation hat in allen Lösungen mit Ausnahme der Lösung 1 mit der stärksten Tween-Konzentration die Ausbreitungsphase und die Phase der kontinuierlichen Phagozytose begonnen. Die Zellen der Kultur zeigen eine beträchtliche Pleomorphie mit einer Reihe von Entwicklungs- und Differenzierungsstadien in annähernd gleichmäßiger Verteilung. Die Zellkulturen mit der Lösung 1 weichen davon ab. Sie enthalten nur ganz vereinzelt die großen der Ausbreitungsphase zuzurechnenden Zellformen bei nur geringer Phagozytose und verringerter Adhärenz als Merkmal der initialen Kulturphase. Nach einer Inkubation von 12o Minuten befinden sich die Zellen aller Kulturen mit Ausnahme jener mit Lösung 1 und 2 überwiegend in der Ausbreitungsphase und entsprechen reifen differenzierten Makrophagen. Mitosen sind nur vereinzelt sichtbar.

Während der gewählten Untersuchungszeiten zeigen die Deckglaskulturen der Peritonealmakrophagen von der Maus bei der Exposition mit den Tween-haltigen Lösungen 3 bis 5 ein Phasenverhalten der Zellen, das dem von BENNETT (1966) beschriebenen regulären entspricht. Die charakteristischen Eigenschaften für die Makrophagenpulation aus dem Peritoneum, die sich von denjenigen der Makrophagen anderer Gegenden des Körpers hinsichtlich des Kulturverhaltens unterscheiden, werden durch die genannten Lösungen nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu ist der Kulturverlauf, der der von uns verwendeten Zellart entsprechen sollte, nach Exposition mit der Lösung 1 und 2 nicht mehr erkennbar.

Was das morphologisch faßbare Verhalten reifer Phagozyten angeht, sprechen HIRSCH und FEDORKO (197o) von der Reizform der Makrophagen als Antwort auf eine besondere chemische Stimulation und Aktivierung durch das umgebende Milieu. Den Modifikationen von Zellen als Ausdruck funktioneller Äußerungen stehen die degenerativen Veränderungen gegenüber mit den Übergängen in die von BESSIS (1964) bezeichnete "Zellagonie". Eine scharfe Grenzziehung zwischen den Erscheinungen einer Zellstimulation, bei der die zellulären Stoffwechselvorgänge einschließlich Enzymaktivitäten innerhalb des Physiologischen liegen, und den Zeichen der zellulären Katabiose mit gestörtem und unter Umständen sistierendem Stoffwechsel ist morphologisch bekanntlich nicht eindeutig durchzuführen (HIRSCH und FEDORKO, 197o), da die gestaltlichen Zeichen zur Beurteilung etwa gestörter Funktionen und sogar von irreversiblen Schädigungen nicht hinreichend sicher sind. Wann die über das Leben entscheidende Reversibilität von zellulären Schäden noch möglich ist, läßt sich morphologisch kaum entscheiden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben bisher nach intravenöser Gabe von Detergentien bei Gewebsmakrophagen der Leber eine Dilatation des endoplasmatischen Retikulums, eine Schwellung und Cristolyse der Mitochondrien sowie eine starke Schwellung der Lysosomen und eine Fragmentierung der Außenmembran ergeben (LOUD und SCHAUB, 1959; BACCINO, 1962; NOVIKOFF und ESSNER, 1962; WATTIAUX, 1963; LOUD und PACK, 1965). Bei einer anderen Zellart, dem Harnblasenepithel von Amphibien, konnten CORRIVEAU et al. (1973) durch nichtionische Detergentien sowohl leichte reversible Veränderungen in Form einer Verschmälerung der Zellmembran, einer Verdichtung des Hyaloplasmas und der sekretorischen Granula als auch schwerwiegende Veränderungen mit vollständiger Zerstörung der Zellstruktur (Schwellung der Zelle und folgende Ruptur der Zellmembran) induzieren. Eine ultrastrukturelle Veränderung der dreischichtigen Zellmembran wurde dabei allerdings nicht festgestellt.

Unsere phasenkontrastmikroskopische Untersuchung der lebendigen Zellen der Deckglaskultur ergibt keine direkten gestaltlichen Beziehungen zwischen gewöhnlichen Phagozyten und solchen, bei denen durch Tween 8o eine Erhöhung der phagozytierenden Tätigkeit induziert worden ist. Dieser Befund ist nach den Regeln der allgemeinen Cytologie auch zu erwarten, dabei muß allerdings die Frage, inwieweit auch ultrastrukturell die Funktionserhöhung ohne gestaltliches Substrat bleibt, offen bleiben.

Es kommen indessen neben den abgerundeten und kleiner erscheinenden lymphomonocytoiden Zellelementen mit rundem oder nierenförmigem Kern häufig Zellen vor, die sich in einem mehr oder weniger fortgeschrittenen Stadium der Ausbreitung befinden und den Reizformen und reifenden Makrophagen sehr nahestehen. Dies um so mehr, als bei diesen Zellen als Ausdruck erhöhter amöboider Beweglichkeit und Verformbarkeit des Zytoplasmas neben einer Zunahme der Zellgröße insgesamt eine Ausbildung breiter Pseudopodien und außerdem von dünnen, teils fadenförmigen Zytoplasmaausläufern und eine mehr gestreckte Form festzustellen ist. Diese Befunde zeigen, daß die Verwendung von Begriffen wie "Aktivierung" oder "Stimulation" von Zellen auch im Falle von Makrophagen vage bleiben und zu semantischen Schwierigkeiten führen muß, wenn versucht wird, die zelluläre Antwort auf einen gegebenen Stimulus allein mit qualitativen Kriterien und nicht auch mit quantitativen Beziehungen beispielsweise funktioneller oder biochemischer Art auszudrücken.

Die regelmäßige Fältelung der Zellmembran, die zahlreichen Granula und phasenhellen mittelgroßen Vakuolen, das Fehlen bezarrer oder starrer Formen der Zellperipherie und die aufgelockert erscheinende Chromatinstruktur der Kerne lassen degenerative oder gar "agonale" (BESSIS, 1964) Zellzustände weitgehend ausschließen. Auch die in Zellen der Deckglaskulturen häufiger auftretenden Stadien amitotischer Teilung und der Nachweis von mehrkernigen Zellen machen degenerative Verän-

derungen höchst unwahrscheinlich. Amitosen sollen in erster Linie zur Entstehung von Riesenzellen führen (LEDER und NICOLAS, 1965; LEDER, 1967).

Es hat sich gezeigt, daß jeder in der Kultur auftretende mononukleäre Zelltyp mit Einschluß auch von kleinen und großen lymphoiden Phagozyten imstande ist, eine Phagozytoseaktivität mit Adhäsion und Fremdteilchenaufnahme zu entwickeln. Dennoch besteht der Eindruck, daß sich die quantitativen Verhältnisse in den Deckglaskulturen mit Zusatz von Tween 8o, bei denen eine Steigerung der Phagozytoserate auftritt (Lösung 3 nach 2o und 6o Minuten), zugunsten größerer Reizformen ähnelnder Makrophagen verschiebt, die bei der Lösung 4 und 5 sowie bei den Kontrollen (ohne Tween) in dieser Weise erst nach längerer Inkubationszeit (12o Minuten) in den Vordergrund treten. Diese qualitative Beobachtung bedeutet in Verbindung mit der gleichzeitigen quantitativen Funktionssteigerung, daß durch Tween 8o eine Stimulierung der kultivierten Zellen zu aktivierten Makrophagen erfolgt.

Bei den höheren Konzentrationen (Lösung 1 und 2) sind die Degenerationsformen der Makrophagen nach einer Inkubationsdauer von 2o Minuten häufig. Dabei ist das Zytoplasma mehr oder weniger homogen und acidophil, z.T. auch durch Flüssigkeitsaufnahme aufgehellt und volumenvermehrt sowie bläschenhaltig, die Zelloberfläche sternförmig, die Kerne sind homogenisiert und fragmentiert. Phasenkontrastmikroskopisch sind sekundär abgerundete Zellen ohne Haftvermögen an der Glasoberfläche vermehrt, auf dem Deckglas ausgebreitete und haftende Makrophagen treten demgegenüber ganz zurück. Zwar ist es durch Umbetten von solchen abgelösten und geschädigten Zellen in ein frisches Tween-freies Kulturmedium vielfach möglich, wieder normale Zellkulturen zu züchten (LIEGL, 197o), jedoch sind nach den cytologischen Befunden die Konzentrationen von Tween 8o in Lösung 1 und 2 für die Makrophagen nach einer Einwirkungsdauer von höchstens 2o Minuten unzuträglich. Die nach

dieser Zeitspanne festgestellte Verminderung der Phagozytoserate ist also eindeutig Ausdruck einer Detergensschädigung der Phagozyten und macht widersprüchliche physikalische Erklärungen, wie sie von ASIDDAO et al. (1964) gegeben werden, überflüssig und hinfällig.

In den höher konzentrierten Lösungen (1 und 2) treten vermehrt Zellen auf, die nach dem morphologischen Befund eine Detergensschädigung annehmen lassen, von der sich aber nicht ohne weiteres sagen läßt, ob sie passager oder irreversibel ist. Diese Annahme wird auch durch funktionelle Kriterien gestützt. Es ist nämlich das für Makrophagen wesentliche funktionelle Merkmal, die Haftung an der Glasoberfläche, verloren gegangen. Damit könnte auch einleuchtend erklärt werden, daß höhere Konzentrationen von Tween 8o die Phagozytoserate senken. Dies erscheint nach der Vorstellung von NORTH (197o) insofern verständlich, da eine geordnete aktive Vergrößerung der Zelloberfläche des Phagozyten entlang einer ebenen Haftfläche einer Art von Invagination entspricht, wie man sich diese bei der Phagozytose etwa bei dem Versuch der Aufnahme einer Kugel von unendlichem Durchmesser vorzustellen hat.

Wenn eine Zelle zur Ausbreitung und Haftung auf Glas außerstande ist, läßt sich dies fast gleichsetzen mit der Unfähigkeit, eine normale Phagozytose zu entfalten. Wird definitionsgemäß die funktionelle Seite des Systems mononukleärer phagozytierender Zellen entsprechend bewertet, ließe sich sagen, daß Tween 8o dicht oberhalb einer zur Phagozytosesteigerung führenden Konzentration nach einer gewissen Einwirkungszeit einen vorübergehenden oder endgültigen Verlust der Makrophageneigenschaft der aus der Peritonealhöhle gewonnenen Zellen herbeiführt und diese Zellpopulation damit des Charakters eines bestimmten Zellsystems beraubt.

Es handelt sich bei der phagozytoseherabsetzenden Wirkung von Tween 8o also um einen Prozeß, der spezifische zelluläre Eigen-

schaften berührt sowie Aktion und Reaktion der Makrophagen und ihrer funktionellen Strukturen in der Peripherie sowie im Inneren der Zellen umfaßt. Dieser Prozeß nimmt, wie bei biologischen Vorgängen nicht verwunderlich, mehr oder weniger Zeit in Anspruch. Diese beträgt in unserem Versuch 2o Minuten, währenddessen stellen sich gleichzeitig eindeutig strukturelle und funktionelle Schäden an den untersuchten Zellen ein. Auch dieser zeitabhängige Faktor dürfte wohl einer physikalischen, allein auf Grenzflächenphänomenen beruhenden Erklärung widersprechen. Es ist bei Außerachtlassung von Veränderungen der Zellstruktur und -funktion nicht ohne weiteres einzusehen, daß physikalische Vorgänge, welche sich im allgemeinen schnell einzustellen pflegen, erst nach gewisser Zeit zu Folgen führen sollen.

In den Lösungen mit niedrigen Konzentrationen von Tween 8o in der Kontrollösung zeigt die Mehrzahl der Makrophagen nach 2o Minuten noch einen ziemlich schmalen Saum von Zytoplasma mit einer mäßigen Granulierung. Diese Zellen entsprechen am ehesten dem lympho-monocytoiden und dem monocytoiden Typ mit rundem oder nierenförmigem Kern nach der ROOS'schen Einteilung der Makrophagen aus serösen Höhlen (197o).

4.3. Abschließende Betrachtung über den experimentell beeinflußbaren Phagozytosemechanismus

Überträgt man die dargelegten theoretischen Erwägungen auf unsere experimentell gewonnenen Ergebnisse, so kann die konzentrations- und zeitabhängige Beeinflußbarkeit der Phagozytoserate durch Tween 8o in vitro nicht eine rein physikochemische Wirkungsweise des Detergens annehmen lassen, wie sie den Vorstellungen von FENN (1921) und PONDER (1928) zugrunde liegt sowie von BERRY et al. (1949) und ASIDDAO et al. (1964) zur Deutung ihrer Ergebnisse herangezogen wurde. BERRY et al. konnten die von ihnen festgestellte Unbeeinflußbarkeit der

Phagozytoseaktivität von Leukozyten, nachdem diese ebenso wie die Testpartikel vor der Phagozytose in Kontakt mit Detergentien gebracht worden waren, gut mit der physikalischen Grenzflächentheorie der Phagozytose in Einklang bringen, zumal biochemische Befunde phagozytierender Zellen noch nicht vorlagen. ASIDDAO et al. stellten zwar die initiale Stimulierung und Hemmung der Phagozytose durch verschiedene Konzentrationen in vivo fest, kontrollierten jedoch nicht gleichzeitig die Strukturverhältnisse der entsprechenden Zellen, was im übrigen in vivo auch auf erhebliche methodische Schwierigkeiten stößt. Auch sie versuchten, ihre Ergebnisse durch die Eigenschaft von Tween 8o zu erklären, nämlich durch seine Grenzflächenaktivität Oberflächenspannungen herabsetzen zu können.

Nach unseren experimentellen Befunden ist die Stimulierung der Phagozytose als einer Kardinalfunktion von mononukleären phagozytierenden Zellen in vitro durch eine geeignete Konzentration von Tween 8o innerhalb eines gewissen Zeitraumes feststellbar. Diese Aktivierung der Phagozytose durch Detergenseinwirkung beruht nicht auf einem Struktur und Funktionen der Zelle gestaltlich nachweisbar beeinträchtigenden Effekt und widerspricht außerdem einer auf die Erniedrigung der Grenzflächenenergie beruhenden Wirkungsweise des Detergens. Dieser Umstand sowie die deutliche Manifestation von ausdifferenzierten reifen Zellformen spricht für eine Einwirkung des Detergens auf die phagozytierende Zelle insgesamt und insbesondere auf ihr Membransystem als das für die Partikelaufnahme wesentliche Strukturelement. Diese Faktoren dürfen für die Aktivierung der Phagozytosetätigkeit verantwortlich sein. Zwar sind morphologisch und funktionell erwartungsgemäß Anhaltspunkte für die dabei wirksamen und vermittelnden aktiven Zellprozesse in unserem Versuchssystem im einzelnen nicht faßbar. Die Tatsache aber, daß ein derartiger Prozeß in dieser Weise durch ein einfach strukturiertes oberflächenaktives synthetisches Molekül bewirkt werden kann, untermauert die Hypothese, daß es möglich ist, die bekannte Aktivierung des komplexen und für

zahlreiche Reaktionen des Organismus so bedeutsamen Vorganges der Phagozytose durch verschiedenartigste Substanzen und kompliziert zusammengesetzte biologische Stoffe auf ein verhältnismäßig einfaches Grundprinzip zurückzuführen, nämlich auf die Labilisierung der zellulären Membransysteme von Makrophagen durch den Kontakt mit nichttoxischen Konzentrationen eines Substrates mit einer detergensanalogen Struktur, d.h. mit einer Gruppe im Molekül, die eine Affinität zu polaren Oberflächen besitzt, und ferner mit einer hydrophoben Molekülgruppe.

Eine Hemmung der Phagozytose durch Detergentien ist ebenfalls möglich, setzt aber nach unseren Ergebnissen eine deutliche strukturelle Beeinträchtigung und allgemeine Funktionsstörung des phagozytierenden Zellsystems und vor allem der zellulären Membranen durch das Detergens voraus und wird durch unphysiologische Detergenskonzentrationen nach einer gewissen Einwirkungszeit realisiert. Auch hier dürften grenzflächenphysikalische Erklärungen nicht zutreffen, sondern sehr wahrscheinlich zell- und membrandesintegrierende Mechanismen zugrunde liegen.

In unserem Versuchssystem liegen die funktionssteigernden und degenerativ bedingten funktionshemmenden Wirkungen von Tween 8o verhältnismäßig eng beieinander und sind nur durch einen Konzentrationsunterschied der Detergenslösung von der Größe des Faktors 1o getrennt. Auch nach theoretischen Überlegungen ist eine phagozytoseaktivierende von einer zelldesintegrierenden Wirkung einer Substanz nicht vollständig trennbar. Allein nach mechanischen Gesichtspunkten müßte eine mit den Funktions- und Erhaltungsprozessen der Zelle zu vereinbarende Desintegration der Membransysteme der Zelle als notwendig postuliert werden, wenn korpuskuläre Stoffe außerhalb der Zelle durch Invagination und Abschnürung der membranumgebenden Vesikel inkorporiert werden. Diese unterliegen im Zuge der intrazellulären Abbauvorgänge, die die abschließende Phase der Phagozytose darstellen, weiteren Fusions- und Auflösungsvor-

gängen. Gerade das membrandesintegrative Moment wird zur Erklärung der "piggy-back"-Phagozytose von SBARRA et al. (1962) herangezogen. Auch die häufige Beobachtung, daß die Zellen nach ausgiebiger Phagozytose oft nicht mehr intakt sind und degenerieren und daß die Zellalterung durch Anhäufung phagozytierten Materials als Restkörper in funktionsuntüchtig gewordenen Lysosomen bewirkt wird, mag mit einer notwendigen funktionellen Membrandesintegration bei der Phagozytose zusammenhängen, die bei einem bestimmten Ausmaß degenerativen Charakter annehmen kann.

Eine genauere Klärung der Rolle oberflächenaktiver Verbindungen bei der Herstellung bestimmter Funktionszustände der Zelle und Zellmembranen ist von weiteren Untersuchungen in vitro mit ultrastrukturellen Analysen ihres Aufbaues und der Aufhellung der einzelnen biochemischen Schritte zu erwarten.

5. Zusammenfassung

1. Der Einfluß der oberflächenaktiven Substanz Tween 8o auf die Phagozytose bei Peritonealmakrophagen der Maus wurde in der Zellkultur untersucht und dabei in verschiedenen Versuchsreihen insbesondere das funktionelle (Phagozytoserate) und strukturelle Verhalten der Makrophagen analysiert.

2. Die Zellen aus der Peritonealhöhle wurden mit Tween-haltigen Lösungen verschiedener Konzentration nach Zusatz einer verdünnten Tuschelösung inkubiert und nach 1o, 2o, 6o und 12o Minuten die Phagozytoseraten bestimmt. Außerdem wurden die Zellen im Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und die mit HE und Gallocyanin gefärbten Zellpräparate aller Versuchsgruppen der üblichen lichtmikroskopischen Analyse unterzogen.

3. In den Inkubationslösungen 1 und 2 mit einer Tween 8o-Konzentration von o,5 % und o,5 x $1o^{-1}$ % ist die Phagozytoserate nach einer Exposition von 2o Minuten im Vergleich zur Kontrollösung signifikant herabgesetzt. Die Phagozyten zeigen gleichzeitig deutliche degenerative Veränderungen, einen irregulären Ablauf der Kulturphasen und den Verlust ihrer Haftung an Glasoberflächen.

4. Bei Einwirkung der Inkubationslösung 3 mit einer Tween 8o-Konzentration von o,5 x $1o^{-2}$ % ist die Phagozytoserate nach 2o und 6o Minuten im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht. Die kultivierten Phagozyten weisen in Verbindung mit der erwiesenen Funktionssteigerung morphologisch auf eine beschleunigte Zellaktivierung innerhalb dieses Zeitraumes hin.

5. Der Konzentrationsunterschied der Lösungen von Tween 8o, die einerseits eine Steigerung der initialen Phagozytoserate, andererseits eine Herabsetzung derselben durch Schä-

digung der phagozytierenden Zellen in der Kultur auszulösen vermögen, bewegt sich nach der gegebenen Versuchsanordnung höchstens um den Faktor 1o.

6. Durch die Inkubationslösung 4 und 5 (Tween 8o-Konzentration von o,5 x $1o^{-3}$ % und o,5 x $1o^{-4}$ %) wird die Phagozytoserate im Vergleich zur Kontrollösung während der Versuchsdauer nicht beeinflußt. Dies gilt auch für das übrige funktionelle und morphologische Verhalten der Makrophagen. Tween 8o steigert nie die nach 12o Minuten bestimmte Phagozytoseaktivität.

7. Die Herabsetzung der Phagozytoserate durch die konzentrierteren Tween 8o-Lösungen 1 und 2 beruht auf reversiblen oder auch irreversiblen Zellschäden und tritt erst nach 2o Minuten ein. Dies spricht gegen einen rein physikochemischen Wirkungsmechanismus des Detergens.

8. Die phagozytosesteigernde Wirkung von Tween 8o und die damit parallel einhergehenden zellulären Befunde stehen am ehesten im Einklang mit einer unspezifischen Aktivierung der Zellmembran, der übrigen bei der Phagozytose mitwirkenden intrazellulären Strukturen und des Zellmetabolismus infolge der bisher bekannten labilisierenden Membranwirkung der Detergentien. Damit ist möglicherweise ein Hinweis gegeben auf einen kleinsten gemeinsamen Nenner bei der Auslösung und Aktivierung der Phagozytose durch zahlreiche verschiedenartige Stoffe. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, daß oberflächenaktiv wirkende Substanzen an die zellulären Membransysteme gelangen.

6. Literaturverzeichnis

1. ALLISON, A.V.: Macrophages in disease processes. In: Conference on Mononuclear Phagocytes, September 2-5, Leiden (1969) zit. nach B. ROOS: Makrophagen. In: STUDER-COTTIER: Handbuch der Allgemeinen Pathologie, Bd. VII, 3. Teil, Berlin, Springer 197o

2. ALLISON, A.C., P. DAVIES and S. DE PETRIS: Role of contractile microfilaments in macrophage movements and endocytosis. Nature New Biology 232, 153 (1971)

3. ALLISON, A.C. and P. DAVIES: Mononuclear phagocyte activation in some pathological processes. In: WAGNER, W.-H., H. HAHN (ed.): Activation of macrophages. Amsterdam: Excerpta Medica 1974, S. 141

4. AMBROSE, E.J.: Cell contacts. In: DANIELLI, J.F., K.G.A. PANKHURST, A.C. RIDDIFORD (ed.): Recent Progress in surface science, Vol. 1, New York: Academic Press 1964, S. 35o

5. ASCHOFF, L.: Das reticuloendotheliale System. Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 26, 1 (1924)

6. ASIDDAO, C.B., J.P. FILKINS and J.J. SMITH: Metabolic and surface factors governing phagocytosis in the perfused rat liver. RES 1, 393 (1964)

7. AXLINE, S.G.: Functional biochemistry of the macrophage. Seminars Hemat. 7, 142 (197o)

8. BACCINO, F.M.: Functional changes of liver mitochondria in rats treated with triton X-1oo. Ital. J. Biochem. 11, 267 (1962)

9. BALDRIDGE, C.W., R.W. GERARD: The extra respiration of phagocytosis. Amer. J. Physiol. 1o3, 235 (1933)

1o. BANGHAM, A.D.: The adhesiveness of leukocytes with special reference to zeta potential. Ann. N.Y. Acad. Sci. 116, 945 (1964)

11. BANGHAM, A.D. and R.W. HORNE: Action of saponin on biological cell membranes. Nature 196, 952 (1962)

12. BANGHAM, A.D. and R.W. HORNE: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope. J. Mol. Biol. 8, 66o (1964)

13. BENNETT, B.: Isolation and cultivation in vitro of macrophages from various sources in the mouse. Am. J. Path. 48, 165 (1966)

14. BENNETT, B., L.J. OLD, E.A. BOYSE: The phagocytosis of tumour cells in vitro. Transplantation 2, 183 (1964)

15. BERRY, L.J. and T.D. SPIES: Phagocytosis. Medicine 28, 239 (1949)

16. BERRY, L.J., R.W. STARR and E.C. HALLER: The effect of surface-acitive agents on phagocytosis. J. Bacteriol. 57, 6o3 (1949)

17. BESSIS, M.: Phagocytosis and other phenomena of sensitized red cells, white cells and platelets. Study by phasecontrast microscopy. Vox Sang. 4, 175 (1954)

18. BESSIS, M.: Studies on cell agony and death: an attempt at classification. In: De REUCK, A.V.S., J. KNIGHT (ed.): Cellular Injury, Ciba Foundation symposium. London: Churchill 1964, S. 287

19. BESSIS, M.: Living Blood cells and their ultrastructure. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1973, S. 486

2o. BESSIS, M., J. BRETON-GORIUS: Différents aspects du fer dans l'organisme. I: Ferritine et micelles ferrugineuses. II: Différentes formes de l'hémosiderine. J. biophys. biochem. Cytol. 6, 231 (1959)

21. BONA, C., A. SULICA, M. DUMITRESCU, D. VRANIALICI: Recognition of altered autologous constituents as foreign by phagocytic cells. Nature 213, 824 (1967)

22. BRÜCHER, H., A. DILL und M. GRÜBER: Untersuchungen über Blut- und Gewebsmakrophagen. Acta haemat. 41, 76 (1969)

23. BURDZY, K., P.G. MUNDER, H. FISCHER, O. WESTPHAL: Steigerung der Phagozytose von Peritonealmakrophagen durch Lysolecithin. Z. Naturforschg. 19b, 1118 (1964)

24. CARPENTER, R.R. and P.B. BARSALES: Uptake by mononuclear phagocytes of proteincoated bentonite particles stabilized with carbodiimide. J. Immunol. 98, 844 (1967)

25. CARR, I. and M.A. WILLIAMS: The cellular basis of RE stimulation: the effects on peritoneal cells of stimulation with glyceryl trioleate, studied by EM and autoradiography. In: DI LUZIO, N.R. and R. PAOLETTI (eds).: The Reticuloendothelial System and Atherosclerosis. New York: Plenum 1967, S. 98

26. CARR, K. and I. CARR: How cells settle on glass: a study by light and scanning electron microscopy of some properties of normal and stimulated macrophages. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 1o5, 234 (197o)

27. CHENG, T.C., E. RIFKIN, H.W.F. YEE: Studies on the internal defense mechanisms of sponges. II. Phagocytosis and elimination of india ink and carmine particles by certain parenchymal cells of Terpios zeteki. J. invert. Path. 11, 3o2 (1968 a)

28. CHENG, T.C., H.W.F. YEE, E. RIFKIN: Studies on the internal defense mechanisms of sponges. I. The cell occurring in the mesoglia of Terpios zeteki (de Laubenfels) (Porifera: Demospongiae). Pacific Sci. 22, 395 (1968 b)

29. CHENG, T.C., H.W.F. YEE, E. RIFKIN, M.D. KRAMER: Studies on the internal defense mechanisms of sponges. III. Cellular reactions in Terpios zeteki to implanted heterologous biological materials. J. invert. Path. 12, 29 (1968 c)

30. COHN, Z.A.: Metabolism and Physiology of Mononuclear Phagocytes. In: ZWEIFACH, B.W., L. GRANT, R.T. MC CLUSKEY: The inflammatory Process. New York, London: Academic Press 1965, S. 323

31. COHN, Z.A.: The structure and function of monocytes and macrophages. Advanc. Immunol. 9, 163 (1968)

32. COHN, Z.A.: Endocytosis and intracellular digestion. In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes. Oxford: Blackwell 1970, S. 121

33. COHN, Z.A and B. BENSON: The differentiation of mononuclear phagocytes. J. exp. Med. 121, 153 (1965)

34. COHN, Z.A., M.E. FEDORKO and J.G. HIRSCH: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. V. The formation of macrophage lysosomes. J. exp. Med. 123, 757 (1966 a)

35. COHN, Z.A., J.G. HIRSCH and M.D. FEDORKO: The in vitro differentiation of mononuclear phagocytes. IV. The ultrastructure of macrophage differentiation in the peritoneal cavity and in culture. J. exp. Med. 123, 747 (1966 b)

36. COHN, Z.A. and S.I. MORSE: Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leucocytes. I. Observations on the requirements and consequences of particle ingestion. J. Exptl. Med. 11, 667 (1960)

37. CORRIVEAU, M., J. BOURGUET et J.S. HUGON: Morphological Modifications of the Frog Bladder induced by non Ionic Detergents. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 14, 69 (1973)

38. DAEMS, W. Th. and P. BREDEROO: The Fine Structure of Mononuclear Phagocytes as revealed by Freeze - Etching. In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes. Oxford: Blackwell 1970, S. 29

39. DE DUVE, Ch. and R. WATTIAUX: Functions of lysosomes. Ann. Rev. Physiol. 28, 435 (1966)

4o. DERVICHIAN, D.G.: Exposés annuels de biologie cellulaire.Problèmes de structure, d'ultrastructures de fonctions cellulaires.
Paris: Masson 1955, S. 1o3

41. DOWBEN, R.M. and W.R. KOEHLER: The Interaction of a Nonionic Detergent with Protein. I. Physical Properties of the Protein Detergent complex.
Arch. Biochem. Biophys. 93, 496 (1961)

42. DURHAM, F.: The Influence of interfacial electrical conditions on the deposition of soil particles on to cotton from detergents solutions.
In: Solid/Liquid Interface and Cell/Water Interface, Proceedings of the second international Congress of surface activity, Bd. IV. London: Butterworths 1957

43. FENN, W.O.: The theoretical responses of living cells to contact with solid bodies.
J. Gen. Physiol. 4, 373 (1921/1922)

44. FRIEND, D.S., W. ROSENAU, J.S. WINFIELD, H.D. MOOW: Uptake and degradation of T2 bacteriophage by rat peritoneal macrophages.
Lab. Invest. 2o, 275 (1969)

45. FURTH, R. van: Origin and kinetics of monocytes and macrophages.
Semin. Haemat. 7, 125 (197o a)

46. FURTH, R. van: The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice.
In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes.
Oxford: Blackwell 197o b, S. 151

47. FURTH, R. van: Discussion.
In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes.
Oxford: Blackwell 197o c, S. 46

48. FURTH, R. van, Z.A. COHN, J.G. HIRSCH et al.: The mononuclear phagocytes system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells.
Bull. Wld. Hlth. Org. 46/6, 845 (1972)

49. GINSBURG, I., M. LAHAV, N. NEEMAN and J.M. JAMES: The inhibition by basic and acidic polyelectrolytes of the degradation of bacteria by leukocyte enzymes. In: WAGNER, W.-H., H. HAHN (ed.): Activation of macrophages. Amsterdam: Excerpta Medica 1974, S. 162

5o. GLAUERT, A.M., J.T. DINGLE and J.A. LUCY: Action of saponin on biological cell membranes. Nature 196, 953 (1962)

51. GLAUERT, A.M. and J.A. LUCY: Globular micelles and the organization of membrane lipids. In: DALTON, A.J. and F. HABUENAU (eds.): The Membranes. New York and London: Academic Press 1968, S. 1

52. GOLDSTEIN, M.N.: Formation of giant cells from human monocytes activated on cellophane. Anat. Rec. 118, 577 (1954)

53. GOODMAN, J.W.: On the origin of peritoneal fluid cells. Blood 23, 18 (1964)

54. GORDON, G.B. and D.W. KING: Phagocytosis. Am. J. Pathol. 37, 279 (196o)

55. GRAHAM, R.C. jr., M.J. KARNOVSKY, A.W. SHAFER, E.A. GLASS and M.L. KARNOVSKY: Metabolic and morphological observation on the effect of surface-active agents on leukocytes. J. Cell Biol. 32, 629 (1967)

56. HALPERN, B.N., B. BENACERRAF, G. BIOZZI, C. STIFFEL: Facteurs régissant la fonction phagocytaire du système réticulo - endothétial. Rev. Hémat. 9, 621 (1954)

57. HAMBURGER, H.J.: Physikalisch-chemische Untersuchungen über Phagozyten. Wiesbaden: J.F. Bergman 1912

58. HARRIS, H.: Chemotaxis and phagocytosis. In: MAC FARLANE, R.G. and A.H.T. ROBB-SMITH (eds.): Functions of the Blood. New York: Academic Press 1961, S. 463

59. HIRSCH, J.G.: Cinemicrophotographic observations on granule lysis in polymorphonuclear leucocytes during phagocytosis.
J. exp. Med. 116, 827 (1962)

6o. HIRSCH, J.G.: Phagocytosis.
Ann. Rev. Microbiol. 19, 339 (1965)

61. HIRSCH, J.G. and M.E. FEDORKO: Morphology of mouse mononuclear phagocytes.
In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes.
Oxford: Blackwell 197o, S. 7

62. HUBER, H. and W. WEINER: Binding of immune complexes to human macrophages: the role of membrane receptor sites.
In: WAGNER, W.-H., H. HAHN (eds.): Activation of macrophages.
Amsterdam: Excerpta Medica 1974, S. 54

63. JACOBI, F.: Macrophages.
In: WILLMER, E.N. (ed.): Cells and tissue in culture. Vol. 2
London and New York: Academic Press 1965, S. 1

64. JENKIN, C.R. and B. BENACERRAF: In vitro studies on the interaction between mouse peritoneal macrophages and strains of Salmonella and Escherichia coli.
J. exp. Med. 112, 4o3 (196+)

65. KARNOVSKY, M.L.: Metabolic basic of phagocytic activity.
Physiol. Rev. 42, 143 (1962)

66. KLING, W.: Wasserlösliche grenzflächenaktive Stoffe. Wasch-, Netz- und Emulgiermittel.
Angew. Chemie 65, 2o1 (1953)

67. KLINGMÜLLER, V. und W. SCHROEDER: Untersuchungen von Eiweißkörpern, besonders des Corneaepithels, und analgetischen, nicht ionenaktiven Netzmitteln.
Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 218, 215 (1953)

68. KOEHLER, W.R. and R.M. DOWBEN: The Interaction of a Nonionic Detergent with Protein. II. Effects on a Bovine Albumin - Azomercurial Complex.
Arch. Biochem. Biophys. 93, 5o1 (1961)

69. KORN, E.D. and R.A. WEISMAN: Phagocytosis of latex beads by acanthamoeba. II. Electron microscopic study of the initial events. J. Cell Biol. 34, 219 (1967)

7o. LEDER, L.D.: Der Blutmonocyt. Berlin: Springer 1967

71. LEDER, L.D. und R. NICOLAS: Untersuchungen zur Genese der Fremdkörperriesenzellen mittels der Hautfenstermethode. Frankf. Z. Path. 74, 62o (1965)

72. LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie. Stuttgart: Georg Thieme 1957, S. 761

73. LIEGL, O.: Die Bedeutung grenzflächenaktiver Substanzen für Virusinfektionen. In vitro-Versuche mit Beziehung zu virusbedingten Augenkrankheiten. Habilitationsschrift Berlin 197o

74. LOUD, A.V. and B.A. PACK: The composition and ultrastructure of liver cells and microsomes from rats with experimentally rates of cholesterol biosynthesis. J. Cell Biol. 27, 14o (1965)

75. LOUD, A.V. and F.F. SCHAUB: Changes in cytoplasmic ultrastructure of rat liver cells with altered cholesterol biosynthesis. J. appl. Phys. 3o, 2o32 (1959)

76. LUCY, J.A. and A.M. GLAUERT: Structure and assembly of macromolecular lipid complexes composed of globular micelles. J. Mol. Biol. 8, 727 (1964)

77. MALHOTRA, S.K. and A. van HARREVELD: Molecular organization of the membranes of cells and cellular organelles. In: BITTAR, E.E. and N. BITTAR (eds.): The biological Basis of medicine. London, New York: Academic Press 1968

78. MARKS, J., M.A. MASON and G. NAGELSCHMIDT: A study of dust toxicity using a quantitative tissue culture technique. Brit. J. industr. Med. 13, 187 (1956)

79. MASSHOFF, W. und K. OEHLER: Der Einfluß der Hypothermie auf die Speicherung in der Leber. Beitr. path. Anat. 131, 184 (1965)

8o. METCHNIKOFF, E.: Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation. Paris: Masson 1892, Reprint New York: Dove Publications 1968

81. MICHELL, R.H., S.J. PANCAKE, J. NOSEWORTHY, M.L. KARNOVSKY: Measurements of rates of phagocytosis. The use of cellular monolayers. J. Cell Biol. 4o, 216 (1969)

82. MUDD, St., M. MC CUTCHEON, B. LUCKE: Phagocytosis. Physiol. Rev. 14, 26o (1934)

83. MUNDER, P.G., M. MODOLELL, E. FERBER and H. FISCHER: The relationship between macrophages and adjuvant activity. In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes. Oxford: Blackwell 197o , S. 445

84. NERMUT, M.V.: Effect of some detergents on the surface membrane of penicillin spheroplasts. Experientia XX, 318 (1964)

85. NEWMAN, J.K., A.E. VATTER and O. K. REISS: Chemical and electron microscopic studies of the black pigment of the human lung. Arch. environm. Hlth. 15, 42o (1967)

86. NORMANN, S.J., D. LAGUNOFF and E.P. BENDITT: Function of the reticuloendothelial system. III. Simultaneous measure of 2 particles during clearance inhibition. Lab. Invest. 19, 353 (1968)

87. NORTH, R.J.: The uptake of particulate antigens. J. Reticuloendothel. Soc. 5, 2o3 (1968)

88. NORTH, R.J.: Endocytosis. Sem. Haemat. 7, 161 (197o)

89. NOVIKOFF, A.B. and E. ESSNER: Pathological changes in cytoplasmic organelles. Fed. Proc. 21, 113o (1962)

9o. OREN, R., A.E. FARNHAM, S. KAZUHISA, E. MILOFSKY and M.L. KARNOVSKY: Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells. J. Cell Biol. 17, 487 (1963)

91. PETHICA, B.A. The physical chemistry of cell adhesion. Exp. Cell. Res., Suppl. 8, 123 (1961)

92. POLICARD, A.: The conflict of living matter with the mineral world: the pneumoconioses. J. clin. Path. 15, 394 (1962)

93. POLICARD, A., A. COLLET et L. GILTOCIRERALYTE: Etude au microscope electronique de tissus lympho-histiocytaires de mammifères au cours de leurs réactions vis-à-vis de la silice. C.R. Acad. Sci., Paris 238, 2478 (1954)

94. PONDER, E.: The influence of surface change and of cytoplasmic viscosity on the phagocytosis of a particle. J. Gen. Physiol. 11, 757 (1928)

95. PONDER, E.: The cell membranes and its properties. In: MIRSKY, A.E. (ed.): The Cell. New York: Academic Press 1961, Vol. 2, S. 1

96. PUTNAM, F.W.: The interactions of proteins and synthetic detergents. Adv. in Protein Chemistry 4, 79 (1948)

97. RABINOVITCH, M.: Phagocytosis: The engulfment stage. Semin. Hemat. 5, 134 (1968)

98. RABINOVITCH, M.: Phagocytotic recognition. In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes. Oxford: Blackwell 197o, S. 299

99. RABINOVITCH, M., P.P. GARY: Effect of the uptake of staphylococci on the ingestion of glutaraldehyde-treated red cells attached to macrophages. Exp. Cell Res. 52, 363 (1968)

1oo. ROBINEAUX, R. and J. FREDERIC: Contribution à l'étude des granulations neutrophiles des polynucleaires par la microcinématographie en contraste de phase. C.R. Soc. Biol. (Paris) 149, 486 (1955)

1o1. ROOS, B.: Makrophagen. In: STUDER-COTTIER: Handbuch der Allgemeinen Pathologie. Bd. VII, 3. Teil, Berlin: Springer 197o, S. 92

1o2. ROSER, B.: The migration of macrophages in vivo. In: FURTH, R. van (ed.): Mononuclear phagocytes. Oxford: Blackwell 197o, S. 166

1o3. ROWLEY, D.: Phagocytosis. Advan. Immunol. 2, 241 (1962)

1o4. ROWLEY, D. and Y.L. WHITBY: The bactericidal activity of mouse macrophages in vitro. Brit. J. exp. Path. 4o, 5o7 (1959)

1o5. SBARRA, A.J. and M.L. KARNOVSKY: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leucocytes. J. Biol. Chem. 234, 1355 (1959)

1o6. SBARRA, A.J., W. SHIRLEY and W.A. BARDAWIL: 'Piggy-back' phagocytosis. Nature (London) 194, 255 (1962)

1o7. SEUFERT, W.D.: Induced permeability changes in reconstituted cell membrane structure. Nature 2o7, 174 (1965)

1o8. SINGER, S.J. and G.L. NICOLSON: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science (New York) 175, 72o (1972)

1o9. SORKIN, E. and S.V. BOYDEN: Studies on the Fate of antigens in vitro. J. Immunol. 82, 332 (1959)

11o. SPECTOR, W.G.: The macrophoges in inflammation. Series haemat. 3, n° 2, 132 (197o)

111. SPITZNAGEL, J.K. and A.C. ALLISON: Mode of action of adjuvants: Retinol and other lysosome-labilizing agents as adjuvants. J. Immun. 1o4, 119 (197o a)

112. SPITZNAGEL, J.K. and A.C. ALLISON: Mode of action of adjuvants: Effects on antibody responses to macrophage-associated bovine serum albumin. J. Immun. 1o4, 128 (197o b)

113. STOSSEL, T.P., R.J. MASON, J. HARTWIG and M. VAUGHAN: Quantitative studies of phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes: Use of emulsions to measure the initial rate of phagocytosis. J. Clin. Invest. 51, 615 (1972)

114. SUTTON, J.S. and L. WEISS: Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epitheloid cells and multinucleated giant cells. An electron microscope study. J. Cell Biol. 28, 3o3 (1966)

115. SWARTZENDRUBER, D.C. and C.C. CONGDON: Electron microscope observations on tingible body macrophages in mouse spleen. J. Cell Biol. 19, 641 (1963)

116. TANAKA, M.: Electron microscopic studies on the mechanism of vital stain, as compared with that of phagocytosis. Proc. Jap. Soc. RES 1, 44 (1961)

117. TANAKA, Y.: An electron microscopic study of nonphagocytic reticulum cells in human bone marrow. I. Cells with intracytoplasmic fibrils. Acta haemat. jap. 32, 275 (1969)

118. THOMAS, J.A.: Conception du système reticulo-histiocytaire: La regulation de l'état histiocytaire et la spécificité cellulaire. Rév. Hémat. 4, 639 (1949)

119. UNANUE, F.R. and J.C. CEROTTINI: The function of macrophage in the immune response. Seminars Haemat. 7, 225 (197o)

12o. VERNON-ROBERTS, B.: The macrophage. Cambridge: University Press 1972, S. 1o9

121. VIROLAINEN, M.: Hematopoietic origin of macrophages as studied by chromosome markers in mice. J. exp. Med. 127, 943 (1968)

122. VOLKMAN, A.: The origin and turnover of mononuclear cells in peritoneal exsudates in rats. J. exp. Med. 124, 241 (1966)

123. VOLKMAN, A. and J.L. GOWANS: The production of macrophages in the rat. Brit. J. exp. Path. 46, 5o (1965 a)

124. VOLKMAN, A. and J.L. GOWANS: The origin of macrophages from bone marrow in the rat. Brit. J. exp. Path. 46, 62 (1965 b)

125. VOLTERRA, M.: Ricerche sul systema reticulo-istiocitario, Lo Sperimentale. Archivio di Biologia normale e pathologica 81, 319 (1927)

126. WALLACH, D.F.H.: The plasma membrane. New York: Springer, Heidelberg Science Library 1972, S. 54

127. WATTIAUX, R., M. WIBO and P. BAUDHUIN: Influence of the injection of triton WR 1339 on the properties of rat liver lysosomes. In: Lysosomes, Ciba Foundation symposium. London: Churchill 1963, S. 176

128. WHITBY, J.L. and D. ROWLEY: The role of macrophages in the elimination of bacteria from the mouse peritoneum. Brit. J. exp. Path. 4o, 358 (1959)

129. WILKINSON, M.: Changes in the phagocytic activity of polymorphonuclear leucocytes following total body X-irradiation in the rat. Blood 9, 81o (1934)

13o. YOUNG, T.: Phil. Trans. Roy. Soc. London 95, 65 (18o5) zit. nach: BAIER, R.E., E.G. SHAFRIN, W.A. ZISMAN: Adhesion: Mechanisms that assist or impede it. Science 62, 136o (1968)

Für technische Hilfeleistungen danke ich den Damen aus dem Forschungslabor des Instituts für Pathologie, Frl. Grüber und Frl. Vandré, sowie den Sekretärinnen Frau Pludra und Frau Tenzer, für die Hilfe bei der Wartung der Tiere Herrn Schmidt, für ihre Hilfsbereitschaft und Besorgung von Material den Herren Kühne, Pankau und Wappenhans. Für ausgiebige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche habe ich Herrn Seifert zu danken. Herr Öhring war mir bei der Anfertigung der Photographien, Herr Jeschke bei der Auswertung der Befunde behilflich. Herr Prof. G. Fuchs hat mir über die statistischen Schwierigkeiten hinweggeholfen. Herr Prof. U. Gross und die wiss. Assistenten des Instituts haben mir ihren Rat reichlich zuteil werden lassen.

Besonders danke ich Herrn Prof. W. Maßhoff für sein unermüdliches Interesse, seine Anregungen und Unterstützung bei der Stellung des Themas, der Planung der Untersuchung und der Herstellung eines korrekten pathologisch-anatomischen Gefüges derselben.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 31. März 1943 in Berlin geboren. Meine Eltern sind Peter und Else Bippus.

1949 wurde ich eingeschult. Das Abitur legte ich am 3. März 1962 am altsprachlichen Staatlichen Ludwigs-Gymnasium in Saarbrücken ab. Zunächst studierte ich 4 Semester Physik und Mathematik an der Universität des Saarlandes. Im Sommer 1964 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg. Dort absolvierte ich am 29.4.1966 das Physikum und nach Studien in Köln und Heidelberg am 12. Mai 1969 das Staatsexamen. Nach 1 1/2 Jahre Tätigkeit als Medizinalassistent an der Medizinischen Universitätspoliklinik Freiburg und dem Städtischen Krankenhaus Lahr/Schwarzwald und der Approbation am 6.12.1971 arbeite ich seit 1. Dezember 1971 als Assistenzarzt am Institut für Pathologie im Klinikum Steglitz.